

## Modulação da Expressão Gênica de *Trypanosoma cruzi* em resposta a compostos bioativos polifenóis sintéticos

Livia Taba Oyafuso<sup>1</sup>;

Marcus Vinicius Bertoldo de Freitas<sup>2</sup>;

Rodrigo da Silva Mauro<sup>3</sup>;

José Augustin Quincoces<sup>4</sup>

Márcia Regina Machado dos Santos<sup>5</sup>

Área do Conhecimento: Ciências da Vida

**Palavras-chaves:** *Trypanosoma cruzi*, forma amastigota, clones cDNA, plasmídeo, bacteriófago.

### INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, constitui um dos maiores problemas de saúde pública das Américas, sendo estimado que cerca de 100 milhões de pessoas ainda correm o risco de contrair esta doença. O ciclo evolutivo deste parasita é caracterizado pela presença de diferentes formas encontradas em dois hospedeiros, um vertebrado outro invertebrado. A epimastigota é encontrada no intestino do inseto, fusiforme com cinetoplasto próximo ao núcleo e flagelo colado à membrana (membrana ondulante) antes de tornar-se livre. Tripomastigotas metacíclicos estão presentes no intestino posterior do barbeiro e são as formas finais do ciclo no inseto e infectantes para o hospedeiro vertebrado. A tripomastigota (sangue de mamíferos) tem corpo celular longo e achatado, flagelo aderido ao corpo celular (membrana ondulante), tornando-se livre na região anterior (e cinetoplasto na extremidade posterior) é responsável pela fase aguda da doença. A forma amastigota, encontrada no interior de células de mamíferos infectados, é ovóide, circular ou fusiforme, tem cinetoplasto visível e flagelo invaginado na membrana (bolso flagelar). É praticamente imóvel, sendo responsável pela forma crônica da doença.

Atualmente estudos da bioquímica do *Trypanosoma cruzi* têm levado a pesquisas de novas drogas e compreensão dos seus mecanismos de ação, tentando abolir o efeito tóxico sistêmico causado pelas drogas usuais de tratamento. Dentre as drogas antiparasitárias frequentemente utilizadas estão o nifurtimox, um derivado do nitrofurano (Bayer, sob o nome de Lampit, recentemente descontinuado) e o benznidazol, um derivado do nitroimidazol (Roche, sob o nome Radanil). Tais drogas agem por geração de radicais livres em seus metabolismos, sendo o *T. cruzi* muito suscetível aos danos causados por

estes radicais. Acredita-se que ambas as drogas matam ou inibem o crescimento do parasita por aumentar seu estresse oxidativo, porém causam também muitos efeitos colaterais nos pacientes em tratamento, principalmente devido à concentração efetiva utilizada.

Devido a essas características, foram realizados testes com compostos fenólicos sintéticos bioativos “*in vitro*” e “*in vivo*” na avaliação da atividade anti *Trypanosoma cruzi* com o objetivo de encontrar um composto com boa atividade anti *T. cruzi* para tratamento da doença de Chagas tanto na fase aguda quanto na crônica, e que fosse menos tóxica que as drogas usuais.

### OBJETIVOS

Neste projeto objetivamos caracterizar as diferenças nos níveis de expressão de genes induzidas por compostos, utilizando técnicas de biologia molecular. Verificaremos as diferenças nos níveis de expressão de genes envolvidos em vias metabólicas, que possivelmente interferem no controle da expressão de proteínas importantes para a susceptibilidade ou resistência do parasita às substâncias utilizadas. Abordaremos aspectos de transcriptoma e proteoma do parasita.

É de suma importância a escolha de modelos experimentais para padronização de protocolos de uso de novos compostos potencialmente terapêuticos para doença de Chagas. As formas epimastigotas são utilizadas para testes iniciais de toxicidade e sensibilidade a drogas. Em relação aos protótipos “*in vivo*”, na padronização de modelos

<sup>1,2,3,4,5</sup>Laboratório de Pós Graduação e Pesquisa em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, UNIBAN

Estudante do Curso de Biomedicina<sup>1,2,3</sup>

Professor da Universidade Bandeirante de São Paulo<sup>4</sup>

Professor orientador da Universidade Bandeirante de São Paulo; e-mail: mrsantos@uniban.br<sup>5</sup>.

para a fase aguda e crônica da doença, o monitoramento de toxicidade e cura são muito importantes (Coura et al, 2002). Há um trabalho recente com *Leishmania* (Serenio et al, 2006) que analisa a utilização de modelos “in vitro” e “in vivo” para “screening” de compostos potencialmente efetivos como terapêutica para tratamento da leishmaniose. Os autores ressaltam a importância da utilização de formas clinicamente relevantes do parasita, os amastigotas intracelulares responsáveis pela manutenção da doença. Considerando os fatos, optamos por também utilizar modelos “in vitro” que mimetizem as formas responsáveis pela instalação (tripomastigotas metacíclicos invadindo células e se diferenciando em amastigotas intracelulares) e manutenção (formas amastigotas intracelulares se diferenciando em tripomastigotas e eclodindo das células) da doença de Chagas no homem. Assim, iremos avaliar a atividade antiparasitária de compostos sintéticos (Pisco et al, 2006) em formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas obtidas de culturas de células VERO infectadas com tripomastigotas metacíclicos, forma oriunda do hospedeiro invertebrado barbeiro e infectivas para o hospedeiro vertebrado humano. Dessa maneira, objetivamos não só determinar o IC50 dos compostos sintéticos (Pisco et al, 2006) capazes de provocar lise em 50 % das células/parasitas, bem como as diferenças nos níveis de expressão de genes induzidas pelos compostos, utilizando técnicas de biologia molecular. Analisaremos as diferenças nos níveis de expressão de genes envolvidos em vias metabólicas, que possivelmente interferem no controle da expressão de proteínas importantes para a susceptibilidade ou resistência do parasita às substâncias utilizadas.

## METODOLOGIA

Neste projeto objetivamos a comparação do RNA do protozoário *T. cruzi* tratado com a droga e o não tratado, utilizando técnicas de biologia molecular. Utilizando duas genotecas de cDNA da forma metacíclica de *T. cruzi* cepa G construídas na UNIFESP em diferentes vetores, um vetor de expressão (plasmídeo) e um vetor bacteriófago. Os clones da genoteca serão isolados em placas de 96 Wells Cell Culture Cluster e, em seguida, réplicas das mesmas realizadas em filtro de náilon, que serão hibridizadas com RNA dos parasitas tratados e não tratados com droga. A comparação dos níveis de expressão determinará a sub (down regulation) ou super (up regulation) expressão de genes induzida pela exposição do parasita aos compostos estudados. Esses clones serão isolados e caracterizados por seqüenciamento e analisados no banco de dados. O seqüenciamento utilizará o kit Big Dye Terminator™ e seqüenciador ABI 310 PRISM™ (Applied Biosystems) no laboratório de biologia molecular do programa de Pós Graduação em Farmácia da UNIBAN BRASIL.

Foi preparada a bactéria *Escherichia coli* Y1090 cultivada em MgSO<sub>4</sub> a 10mM e maltose a 0,2% a 37°C durante 16 horas com agitação. As bactérias foram centrifugadas por 6 a 4000 rpm e resuspendidas em metade do volume de SM para atingir a OD igual a 0,6. As bactérias (200 µl) foram infectadas a 37°C por 30 minutos, com 100 µl das respectivas diluições da genoteca em bacteriófago. Em seguida, o material foi adicionado a 4ml de LB Top Agar a 50°C e recolocado rapidamente sobre placas de LB sólido, para haver crescimento das bactérias e para obtenção de placas de lise semi confluentes. Foram isolados 200 clones de cDNA da forma metacíclica de *T. cruzi* em 300 µl de SM estéril mais 30 µl de clorofórmio. Os clones permaneceram acondicionados a 4° Celsius, para posterior caracterização com soro chagásico.

Sobre placas de petri contendo meio LB Agar ampicilina na concentração de 100 µg/ml, pipetou-se 100 µl da genoteca construída em vetor plasmídeo e o material foi semeado com a alça de Grigalski. As placas foram incubadas em estufa a 37° C por 16 horas. Após o crescimento das colônias, as mesmas foram isoladas para poços de placas de 96 well com meio LB Agar/Amp com palitos estéreis e o crescimento foi conduzido em estufa a 37° C “overnight”. Replicadas com o replicator em outra placa de 96 well, sendo que uma placa foi congelada (Congelamento com 15% de glicerol a -20° C.) e a outra utilizada para caracterização dos clones através de hibridação de sua réplica em filtro de náilon com sonda radioativa de interesse.

Formas AMASTIGOTAS: os testes “in vitro” foram realizados em cultura de células VERO infectadas com *Trypanosoma cruzi* (cepa CL) tratadas com os compostos sintéticos em diferentes concentrações com a finalidade de estabelecer a IC50 e uma concentração ideal no tratamento da doença na fase crônica. Foram feitos os controles necessários: células infectadas tratadas com Benzonidazol e células infectadas sem tratamento. Os resultados foram analisados e os compostos que obtiveram resultados promissores foram testados “in vivo”.

Formas TRIPOMASTIGOTAS SANGÜÍNEAS: a partir da concentração definida “in vitro”, os camundongos foram infectados com *Trypanosoma cruzi* (cepa CL) induzindo nos animais a fase aguda da doença. Em seguida, os animais foram tratados com os compostos sintéticos (dose única) administrados por via oral através da técnica de gavagem (cânula intra-gástrica), sendo utilizados como controle camundongos infectados tratados com Benzonidazol e camundongos infectados sem tratamento. Os resultados foram obtidos através da parasitemia (contagem de parasitas presentes no sangue).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados 500 clones cDNA da forma metacíclica do *Trypanosoma cruzi* em vetor plasmídeo e em placas de 96 wells e, em seguida, réplicas em filtros de nylon para transferência dos clones. As placas estão estocadas em duas cópias, uma a -20° C e outra na geladeira. Os filtros reéplicas serão posteriormente utilizados para a caracterização de clones reagentes com soro chagásico.

Outra abordagem foi o isolamento de 200 clones da forma metacíclica do parasita construído em vetor bacteriófago e que estão isolados em tubos eppendorf a 4° C. Réplicas de placas contendo essas placas de lise ordenadas também foram feitas para reagir com sondas de interesse ou soro chagásico.

A iniciativa de utilização de dois modelos de genoteca em paralelo deu aos alunos a comparação de metodologias com diferentes nuances, devido a peculiaridades diferentes dos vetores utilizados.

Podemos considerar também que a análise dos insertos dos clones, que em plasmídeo têm tamanho aproximado de 900pb, deve ter no bacteriófago tamanho de inserto variando de 2000 a 5000 pb, o que ajuda na busca de seqüências regulatórias dos genes ali contidos.

As Figuras 1 e 2 resumem os resultados dos experimentos “in vitro” e “in vivo” com compostos sintéticos bioativos.

## CONCLUSÕES

O presente projeto teve por objetivo analisar e avaliar as amostras dos clones isolados de *Trypanosoma cruzi* para caracterização com soro de paciente chagásico. Em seguida, serão realizadas as hibridizações dos filtros com a sonda radiativa para a caracterização dos clones diferenciais e sua posterior caracterização por técnica de seqüenciamento. Assim, conclui-se que a biologia molecular e celular por si só são de extrema eficiência a fim de auxiliar, mensurar e sobretudo avançar nas pesquisas visando ao tratamento das parasitoses que trazem prejuízos à saúde pública.

Nos experimentos com os compostos bioativos, após a análise dos testes “in vitro”, concluímos que os compostos que mais obtiveram ação anti *T. cruzi* na forma amastigota intracelular foram os compostos DB2, DB3 e DM1 de maneira dose dependente.

Após a análise dos testes “in vivo”, concluímos que o composto que mais obteve ação anti *T. cruzi*, na forma tripomastigota sanguíneo, foi o DB3 controlando a parasitemia de forma semelhante ao benzonidazole, droga usual de tratamento da Doença de Chagas. Já o composto DM1, que “in vitro” se comporta como bom agente antiparasitário, mostrou que a via utilizada não foi a ideal pelo fato de o pH ácido do estômago do animal protonar o composto e torná-lo insolúvel, impedindo assim sua absorção pelas células do estômago.

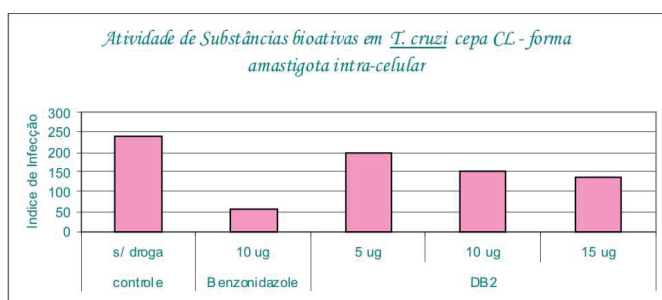
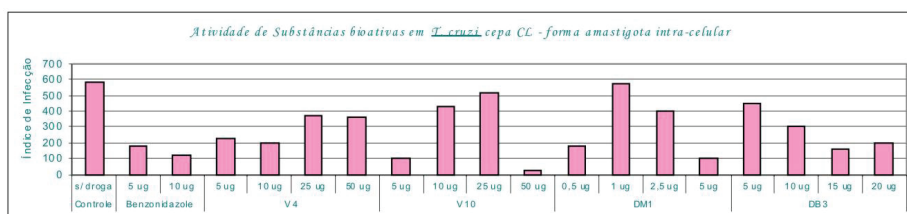
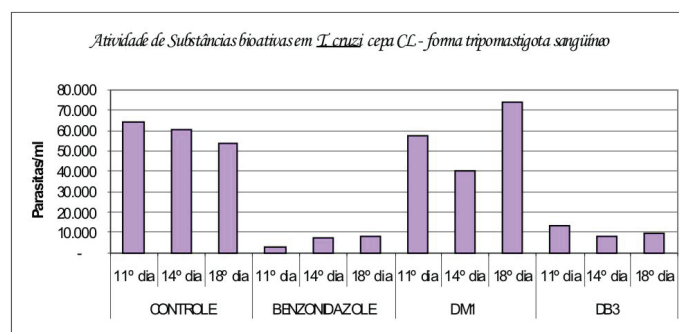


Figura 2. Atividade dos compostos sintéticos “in vivo”. O modelo utilizado foi o camundongo Swiss infectado com *Trypanosoma cruzi* cepa CL e tratado por via oral com a técnica de gavagem. A infecção foi acompanhada pela contagem da parasitemia.

Figura 1. Atividade de compostos sintéticos “in vitro”. As concentrações diferentes dos compostos definem diferentes índices de infecção dos macrófagos, considerando também o número de amastigotas intracelulares.



### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVILA AR, DALLAGIOVANNA B, YAMADA-OGATTA SF, MONTEIRO-GOES V, FRAGOSO SP, KRIEGER MA, GOLDENBERG S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Genet Mol Res. 2003 Mar 31;2(1):159-68.
- BAPTISTA CS, VENCIO RZ, ABDALA S, VALADARES MP, MARTINS C, DE BRAGANCA PEREIRA CA, ZINGALES B. DNA microarrays for comparative genomics and analysis of gene expression in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2004 Dec;138(2):183-94.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 27: 347 - 382, 1973.
- MAYA JD, CASSELS BK, ITURRIAGA-VASQUEZ P, FERREIRA J, FAUNDEZ M, GALANTI N, FERREIRA A, MORELLO A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2006 Mar 12.
- MINNING TA, BUA J, GARCIA GA, MCGRAW RA, TARLETON RL. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. : Mol Biochem Parasitol. 2003 Sep;131(1):55-64.
- PISCO L, KORDIAN M, PESEKE K, FEIST H, MICHALIK D, ESTRADA E, CARVALHO J, HAMILTON G, RANDO D, QUINCOCES J. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. Eur J Med Chem. 2006 Mar;41(3):401-7. Epub 2006 Jan 27.
- RODRIQUES COURA J, DE CASTRO SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Jan;97(1):3-24. Review.