



# Estudos Avançados em Genética e Farmacologia

Natiele Carla da Silva Ferreira  
(Organizadora)



# Estudos Avançados em Genética e Farmacologia

Natiele Carla da Silva Ferreira  
(Organizadora)

**Editora Chefe**  
Marcia A. A. Marques  
**Editora Adjunta**  
Isabela Arantes Ferreira  
**Bibliotecária**  
Eliete Marques da Silva  
**Diagramação**  
Ricardo Augusto do Nascimento  
**Arte da capa**  
Matheus Lacerra  
**Imagem da Capa**  
Freepik  
**Revisão**  
Os Autores

O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial Não Derivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).



2021 by Bookerfield Editora  
Copyright © Bookerfield Editora  
Copyright do Texto © 2021 Os autores  
Copyright da Edição © 2021 Bookerfield Editora  
Os autores cedem à Bookerfield Editora os direitos para esta edição.

Esta obra é de natureza digital (e-book). Versões impressas são permitidas, não tendo a Bookerfield Editora qualquer responsabilidade pela confecção e distribuição de exemplares físicos deste conteúdo.

Todos os manuscritos da obra passaram por rigorosa avaliação cega pelos pares, baseadas em critérios científicos e imparciais, recebendo a aprovação após atender os critérios técnicos estabelecidos pelo Conselho Editorial.

Todo o conteúdo do livro e de artigos individuais é de responsabilidade exclusiva de seus respectivos autores, não sendo a Bookerfield Editora responsável por quaisquer eventuais irregularidades. Situações como plágio, má conduta ética/científica ou dados e resultados fraudulentos são de responsabilidade do autor, comprometendo-se a Bookerfield Editora em investigá-las rigorosamente e tomar as ações cabíveis.

O download, compartilhamento e referência da obra são permitidos mediante atribuição de crédito aos autores e à Editora. A comercialização desta obra é expressamente proibida.

## CONSELHO EDITORIAL

### CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Elson Barbosa da Silva Junior  
Alirya Magda Santos do Vale Gomes  
Flávio José Rodrigues Cruz  
Joelma Leão Buchir  
Heiriane Martins Sousa  
Monyck Jeane dos Santos Lopes  
Daniela Kunkel  
Afrânio Silva Madeiro  
Ana Luiza Trovo Marques de Souza  
Maria Cristina Bueno Coelho  
Daniele Cristina Ficanha  
Carlos Eugenio Fortes Teixeira  
Pablo Daniel Freitas Bueno  
Kleber Fernando Pereira  
Fabiana Schiochet  
João Francisco Severo Santos  
Jairton Fraga Araujo  
Renato Jaqueto Goes  
André Giarola Boscarato  
Fernanda Morcatti Coura  
Guilherme Donadel  
Fernanda Beatriz Pereira Cavalcanti

### CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Joelma Leão Buchir  
Érika Alves Tavares Marques  
Renato Luís Veiga Oliveira Júnior  
Morgana do Nascimento Xavier  
Flávio José Rodrigues Cruz  
Patricia Köster e Silva  
Heiriane Martins Sousa  
Fabíola Aliaga de Lima  
Jaqueline Rocha Borges dos Santos  
Noemi Mendes Fernandes  
Mário César de Oliveira  
José Amorim  
Débora Cristina Damasceno  
Kleber Fernando Pereira  
Bianca Barros da Costa  
Pedro Paulo Gattai Gomes  
Raquel Ayres  
Benedito Rodrigues da Silva Neto  
Letícia Dias Lima Jedlicka  
Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro  
Pedro de Souza Quevedo  
Luciano Fogaça de Assis Montag  
José Leonardo Lima Magalhães  
Valéria de Albuquerque Pires

Viviane Abrantes Perdizio  
Bruna Martins Dellagnezze

### CIÊNCIAS DA SAÚDE

Luciane Cristina Arantes  
Fabio José Antonio da Silva  
Elisângela Rodrigues Carrijo  
José Aderval Aragão  
Rogério Wagner da Silva  
Carlos Vinícius Pagani Vieira Machado  
José Robertto Zaffalon Júnior  
Juliane Campos Inácio  
Vivian Victoria Vivanco Valenzuela  
Marcelo de Oliveira Pinto  
Ana Luiza Trovo Marques de Souza  
Nara Michelle Moura Soares  
Taíza Fernanda Ramalhais  
Jaqueline Rocha Borges dos Santos  
Renato Carlos Machado  
Marcos Guimarães de Souza Cunha  
Marcello Alberton Herdt  
Fabiana Leticia Sbaraini  
Débora Cristina Damasceno  
Andressa Ribeiro Contreira  
João Francisco Severo Santos  
Líncon Bordignon Somensi  
Sheila Moura Amaral  
Bianca Barros da Costa  
Pedro Paulo Gattai Gomes  
Raquel Ayres  
Renata Oliveira de Barcelos  
Paulo Celso Budri Freire  
Alexandre Visconti Brick  
Estélio Henrique Martin Dantas  
Eveline Fernandes Vale  
Emanuel Tenório Paulino  
Diogo de Sousa Martins  
Jovino Gentilini Junior  
Deborah Margatho Ramos Gonçalves  
Roberson Geovani Casarin  
Maria Patricia Costa Villela  
André de Araújo Pinto  
Bárbara de Lima Lucas  
Sergio Ibañez Nunes  
Marcela Melo dos santos  
Aline Correa de Carvalho



## **CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA**

Vagner Marques de Moura  
João César Abreu de Oliveira Filho  
Andrea Sartori Jabur  
Dalvani Fernandes  
Evandro Preuss  
Isidro ihadua  
Cláudia Hitomi Watanabe Rezende  
Valdecir Alves dos Santos Júnior  
Lívia Sancho  
Henrique Mariano Costa do Amaral  
Henrique Pereira Oliveira d'Eça Neves  
Gisane Aparecida Michelon  
Sonia Tomie Tanimoto  
Manolo Cleiton Costa de Freitas  
Tânia do Carmo  
Gerson Cruz Araujo  
Paulo Celso Budri Freire  
Marcos Vinicius de Oliveira Peres  
Antônio Carlos Ribeiro Araújo Júnior

## **CIÊNCIAS HUMANAS**

Camila de Vasconcelos Tabares  
Marcos Pereira dos Santos  
Elisângela Rodrigues Carrijo  
Miguel Rodrigues Netto  
João César Abreu de Oliveira Filho  
Dalvani Fernandes  
Breno Henrique Ferreira Cypriano  
Rebecca Bianca de Melo Magalhães  
Bruno Cezar Silva  
Taíza Fernanda Ramalhais  
Ana Margarida Theodoro Caminhas  
Josael Jario Santos Lima  
Eulalia Fabiano  
Marcos Pereira Magalhães  
Tatiane dos Santos Duarte  
Camila Bueno Grejo  
João Francisco Severo Santos  
Anderson Dantas da Silva Brito  
Ana Maria Senac Figueroa  
Edonilce da Rocha Barros  
Luciano Sérgio Ventin Bomfim  
Roberson Geovani Casarin  
Cássia Maria Bonifácio

## **CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS**

Renato Obikawa Kyosen  
Horácio Monteschio  
Camila Nathalia Padula de Godoy  
Elisângela Rodrigues Carrijo  
Miguel Rodrigues Netto

Bruno Cezar Silva  
Solange Kileber  
Nelson Calsavara Garcia Junior  
Ana Margarida Theodoro Caminhas  
Josael Jario Santos Lima  
Eulalia Fabiano  
Daniel Nascimento e Silva  
João Francisco Severo Santos  
Camila Augusta Alves Pereira  
Fabricio Lemos de Siqueira Mendes  
Leandro Nunes Soares da Silva  
Dandara Scarlet Sousa Gomes Bacelar  
Patrícia Loureiro Abreu Alves Barbosa  
Stella Villela Florêncio  
Sandy Rodrigues Faidherb  
Gelson Mario Filho  
Veyzon Campos Muniz  
Silvia Helena Ribeiro Cruz  
Fabio Adriano Stürmer Kinsel  
Ygor de Siqueira Mendes Mendonça  
Helga Midori Iwamoto  
Thiago Nery Pandolfo  
Darline Maria Santos Bulhões  
Hector Rodrigo Ribeiro Paes Ferraz  
Lucas Rosas de Freitas Sá Barreto  
Denise Tanaka dos Santos  
Nagib Abrahão Duailibe Neto

## **ENGENHARIAS**

Elaine Patricia Arantes  
Marcelo Henrique da Silva  
Thiago Averaldo Bimestre  
Fernando Oliveira de Andrade  
Andrea Sartori Jabur  
Valdecir Alves dos Santos Júnior  
Alejandro Victor Hidalgo Valdivia  
Daniele Cristina Ficanha  
Marcos Guimarães de Souza Cunha  
Marcelo Marques  
Henrique Mariano Costa do Amaral  
Arlete Barbosa dos Reis  
Jefferson Sousa Farias  
Renata Jardim Martini  
Letícia Reis Batista Rosas  
Diego Matheus Sanches  
Mileni Cristina da Silva  
Ana Carla Fernandes Gasques  
Alex Milton Albergaria Campos  
Cristhiane Michiko Passos Okawa  
Leila Cristina Nunes Ribeiro  
Tiago Brandão Costa  
Laís Roberta Galdino de Oliveira

## **LINGUÍSTICA, LETRAS E ARTES**

Márcia Donizete Leite-Oliveira

Thiago Blanch Pires

Vera Regiane Brescovici Nunes

Anderson Dantas da Silva Brito

Jane Catia Pereira Melo

Danuzia Marjorye Santos de Araújo

Adriana dos Reis Silva

Luceni Lazara da Costa Ribeiro

Maria Christina da Silva Firmino Cervera

Simone Oliveira Vieira Peres

## **MULTIDISCIPLINAR**

Érika Alves Tavares Marques

Isidro ihadua

Andrea Sartori Jabur

Fernando Oliveira de Andrade

Cláudia Hitomi Watanabe Rezende

Alejandro Victor Hidalgo Valdivia

Ana Margarida Theodoro Caminhas

Marcelo Marques

José Amorim

Fabricio Lemos de Siqueira Mendes

Arlete Barbosa dos Reis

Ana Carla Fernandes Gasques

Cristhiane Michiko Passos Okawa

## Estudos Avançados em Genética e Farmacologia

**Editora Chefe** Marcia A. A. Marques  
**Editora Adjunta** Isabela Arantes Ferreira  
**Bibliotecária** Eliete Marques da Silva  
**Diagramação** Ricardo Augusto do Nascimento  
**Revisão** Os Autores

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Estudos avançados em genética e farmacologia  
[livro eletrônico] / Natiele Carla da Silva  
Ferreira, organizadora. -- São Paulo, SP :  
Bookerfield, 2022.  
PDF

Vários autores.  
Bibliografia.  
ISBN 978-65-89929-56-7

1. Estudos científicos - Coletâneas
2. Farmacologia 3. Genética I. Ferreira, Natiele  
Carla da Silva.

22-109048

CDD-500

#### Índices para catálogo sistemático:

1. Genética e farmacologia : Estudos científicos 500

Eliete Marques da Silva - Bibliotecária - CRB-8/9380

**DOI 10.53268/BKF22050300**

**Bookerfield Editora**

São Paulo – Brasil

Telefone: +55 (11) 98441-4444

[www.bookerfield.com](http://www.bookerfield.com)

[contato@bookerfield.com](mailto:contato@bookerfield.com)



## APRESENTAÇÃO

Genética (do grego “*genétikós*”) significa “capaz de gerar”, indicando o seu papel na gênese da vida. A Genética é a ciência que estuda os genes, a hereditariedade e a transmissão de caracteres através das gerações. Durante o século XIX, essa ciência evoluiu significativamente a partir dos experimentos de Gregor Mendel com as ervilhas, que resultou na postulação das primeiras leis da Genética. O segundo grande avanço dessa ciência ocorreu durante a década de 1950, com a elucidação da estrutura do DNA. Posteriormente, houve significativos progressos na Genética que resultaram em diversas áreas de pesquisa. Atualmente, a Genética está cada vez mais incluída em nosso cotidiano. Ao fazermos uma breve pesquisa nos noticiários, podemos perceber como o melhoramento genético vem sendo bastante explorado na indústria agropecuária, como a manipulação genética de mosquitos da espécie *Aedes aegypti* pode afetar toda a sua população, ou ainda como os estudos nessa área podem nos auxiliar no entendimento de doenças fetais e câncer.

Outra ciência que tem avançado simultaneamente com a Genética é a Farmacologia (do grego “*phármakon*”, droga; e “*lógos*”, estudo), isto é, a ciência que estuda os efeitos de uma substância química (fármaco) sobre os sistemas biológicos (organismo). O uso de substâncias de origem vegetal e animal para o tratamento de doenças remonta desde tempos antigos (antes de Cristo). Contudo, a Farmacologia se consolidou como ciência no século XIX, sendo que nessa mesma época foi criado o primeiro instituto de pesquisa em Farmacologia na Europa. Desde então, essa ciência evoluiu significativamente, se apoiando em outras áreas de estudo como a Fisiologia, a Química, a Patologia, entre outros, evidenciando o seu caráter multidisciplinar. Atualmente, existem diversos ramos da Farmacologia, tais como a Química Médica, a Toxicologia, a Farmacologia Clínica e a Farmacogenética, demonstrando que essa ciência está expandindo a sua área de atuação constantemente.

Nesse cenário, o objetivo desse livro é apresentar alguns avanços recentes nas áreas de Genética e Farmacologia com aplicação na filogenia, no câncer, em doenças infecciosas e no estudo de receptores com potencial terapêutico. Espero que o leitor aprecie os resultados obtidos por pesquisadores dessas áreas de pesquisa. Boa leitura!

**Natiele Carla da Silva Ferreira**  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>10</b>
<b>O RECEPTOR B2 DE CININA NÃO EXERCE EFEITOS RENOPROTETORES EM MODELO DE RABDOMIÓLISE INDUZIDA POR GLICEROL EM CAMUNDONGOS</b>	
Michel Monteiro Macedo Erivelton Fernandes França Fernando Francisco Pazello Mafra Romildo Torres da Silva Pedro Paulo Gattai Gomes	
<b>DOI 10.53268/BKF22050301</b>	
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>23</b>
<b>ASPECTOS MOLECULARES ASSOCIADOS À CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA E À REATIVAÇÃO DA INFECÇÃO EM PACIENTES CARDIOPATAS TRANSPLANTADOS</b>	
Priscilla Almeida da Costa Andréa Mara Macedo	
<b>DOI 10.53268/BKF22050302</b>	
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>40</b>
<b>A REGULAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO DE DANOS DE DNA POR AGENTES TERAPÊUTICOS EM GLIOBLASTOMA</b>	
Paulo Matheus Guerra Ribeiro de Sousa Rodrigues	
<b>DOI 10.53268/BKF22050303</b>	
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>53</b>
<b>CONCILIANDO MORFOLOGIA E MOLÉCULAS EM RECONSTRUÇÕES DA HISTÓRIA EVOLUTIVA DE PROTISTAS CILIADOS</b>	
Noemi Mendes Fernandes	
<b>DOI 10.53268/BKF22050304</b>	
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>65</b>
<b>IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DA ENZIMA NUCLEOSÍDEO HIDROLASE DE <i>Leishmania donovani</i> A PARTIR DE EXTRATOS DA FLORA FLUMINENSE</b>	
Gregório Torres Rangel Luzineide Wanderley Tinoco	
<b>DOI 10.53268/BKF22050305</b>	
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>80</b>
<b>TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO UTILIZANDO ENSAIO DE MENSURAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR APLICADA À DESCOBERTA DE ANTAGONISTAS PARA RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y2 E P2Y4</b>	
Natiele Carla da Silva Ferreira Rômulo José Soares Bezerra Luiz Anastacio Alves	
<b>DOI 10.53268/BKF22050306</b>	



# CAPÍTULO 1

## O RECEPTOR B2 DE CININA NÃO EXERCE EFEITOS RENOPROTETORES EM MODELO DE RABDOMIÓLISE INDUZIDA POR GLICEROL EM CAMUNDONGOS

### Michel Monteiro Macedo

Faculdade para o Desenvolvimento Sustentável da Amazônia, Parauapebas-PA  
<http://lattes.cnpq.br/1741397455917609>

### Erivelton Fernandes França

Centro Universitário Carlos Drummond de Andrade, São Paulo-SP  
Centro de Estudos em Saúde da Faculdade Unyleya, Brasília-DF  
<http://lattes.cnpq.br/9639049725744850>

### Fernando Francisco Pazello Mafra

Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes-SP  
<http://lattes.cnpq.br/5446222436593823>

### Romildo Torres da Silva

Universidade Nove de Julho, São Paulo-SP  
<http://lattes.cnpq.br/1356134327136951>

### Pedro Paulo Gattai Gomes

Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP  
<http://lattes.cnpq.br/2896129904389035>

## RESUMO

Investigamos o papel protetor do receptor B2 de cininas em modelo animal com rabdomiólise induzida por glicerol. Camundongos machos C57Bl/6 (n=28) foram separados em 4 grupos: selvagens

não tratados, knockout B2 não tratados, selvagens tratados e knockout B2 tratados. Aqueles tratados com glicerol receberam uma injeção de glicerol (50% v/v, 7 mL/kg, i.m.). Após 48 h, urina e sangue foram coletadas para dosagem de creatinina e ureia. Rins foram extraídos para avaliação histológica, e níveis de expressão de mRNA de receptores B1 e B2 de cininas e mediadores inflamatórios foram medidos por qPCR. A creatinina e ureia séricas mostraram diferenças entre camundongos selvagens não tratados e tratados ( $0,66 \pm 0,04$  vs  $2,61 \pm 0,53$  mg/dL,  $P < 0,01$ ;  $33,51 \pm 2,08$  vs  $330,2 \pm 77,7$  mg/dL,  $P < 0,005$ ), e entre camundongos knockout B2 não tratados e knockout tratados ( $0,56 \pm 0,03$  vs  $2,23 \pm 0,87$  mg/dL,  $P < 0,05$ ;  $42,49 \pm 3,2$  vs  $327,2 \pm 58,4$  mg/dL,  $P < 0,01$ ), não houve diferença entre camundongos selvagens tratados e camundongos knockout B2 tratados. O glicerol induziu aumento na expressão do receptor B2 de cininas ( $> 30$  vezes,  $31,34 \pm 8,9$ ) nos rins. Animais injetados com glicerol apresentaram maior grau de lesão que os animais não tratados. Camundongos selvagens e knockout tratados apresentaram lesão renal, com comprometimento da função renal. Camundongos knockout B2 tratados não apresentaram um fenótipo diferente nos marcadores de lesão renal, quando comparados ao grupo tratado selvagem. Concluímos que o receptor B2 de cininas não tem papel protetor na lesão renal.

**Palavras-chave:** Cininas, lesão renal aguda, Modelos animais, Rabdomiólise, Músculo esquelético.

## 1. INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda (LRA) é uma doença comum com risco de vida que impõe um fardo pesado ao sistema de saúde (Costa-Neto et al., 2008). Foi relatado que a taxa de mortalidade para esta doença varia de 10% a 80%. Outros estudos sugerem que a LRA pode ser um passo na progressão para doença renal crônica (Heung et al., 2012), em humanos e animais (Sanoff; Okusa, 2011).

Os principais fatores que predis põem os pacientes à LRA incluem instabilidade hemodinâmica, hipovolemia, hipóxia, isquemia e reperfusão (I/R), queimaduras, entre outros (Bosch et al., 2009). Existem vários modelos utilizados para estudar esta doença; um deles é o modelo de rabdomiólise induzida por glicerol em que a LRA ocorre após lesão muscular. Neste modelo experimental nefrotóxico, os produtos residuais do metabolismo, como enzimas e outras moléculas (por exemplo, ácido úrico e mioglobina), causam lesão renal nos túbulos proximal e distal (Bosch et al., 2009). Tais lesões causam um declínio abrupto (em questão de horas ou dias) na função renal.

Em condições inflamatórias renais, como a LRA, o sistema caliceína-cininas (KKS) desempenha um papel importante na homeostase da glicose (Araújo et al., 2006; Barros et al., 2012). Esse sistema também está envolvido em processos inflamatórios e vasodilatadores renais (Bhoola et al., 1992), que estão diretamente envolvidos no mecanismo de resposta inflamatória da LRA. A resposta inflamatória da LRA envolve a indução de isquemia vascular local, hipóxia e lesão tubular (Bosch et al., 2009). KKS exerce suas ações ativando dois receptores: B1 (B1R) e B2 (B2R) (Regoli et al., 1980). A ativação do B1R é induzível e ocorre em condições patológicas como na isquemia (Marceau et al., 1998), enquanto o B2R é constitutivamente ativo em circunstâncias fisiológicas normais (Regoli et al., 1980). Além disso, alguns autores (Naicker et al., 1999) mostraram que há menos B2R em néfrons de ratos afetados por doença renal. Está bem estabelecido que as cininas são geradas rapidamente após a lesão tecidual e que têm um papel central no desenvolvimento e manutenção de processos inflamatórios, sejam eles agudos ou crônicos (Costa-Neto et al., 2008).

Existe um KKS renal (Klein et al., 2011) que pode responder de forma mais específica à LRA. Outro sistema que poderia estar envolvido no mecanismo da LRA, como observado no modelo de rabdomiólise induzida por glicerol, é o sistema renina-angiotensina (RAS). Uma queda na pressão arterial, tipicamente observada durante um estado hipovolêmico, ativar esse sistema e induzirá a perfusão renal (Canteras, 2011). É importante notar que, o KKS renal pode ativar o RAS (Scicli et al., 1986). Em um estudo recente do nosso laboratório (Amorim et al., 2013), mostramos que existe uma relação entre os polimorfismos genéticos da ECA e B2R, onde o primeiro pode modular as cininas em pacientes renais transplantados. Em outros modelos animais de lesão renal, foi demonstrado que o B2 tem um possível papel protetor

(Wang et al., 2008), enquanto outros mostraram que tem um papel deletério (Chiang et al., 2006).

Está descrito na literatura que os B2R estão em todas as porções do néfron, exceto em podócitos de rim humano (Song et al., 1996). Além disso, é descrito que os níveis de NO caem na rabdomiólise (Bosch et al., 2009), e que a ativação do B2R está relacionada com a produção de NO (Kon e Hunley, 2007). Assim, o objetivo deste estudo é investigar o papel do B2R no rim em um modelo animal de rabdomiólise induzida por glicerol.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Design experimental

Este estudo teve início apenas com a aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP, nº 0300/11), e os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os animais foram cedidos pelo Centro de Desenvolvimento da Medicina e Biologia Experimental (CEDEME) da UNIFESP. Vinte e oito camundongos C57Bl/6 machos de 3 meses de idade foram usados. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: WT (n = 5), glicerol WT (GWT, n = 9), B2KO (n = 6) e glicerol B2KO (GB2KO, n = 8). Todos os animais foram colocados em gaiolas individuais (Alesco, Brasil) em ambiente com temperatura controlada (21 °C), ciclo claro/escuro de 12 h por uma semana e água e ração padrão ad libitum.

Os grupos WT e B2KO foram grupos controle e não receberam tratamento. Os animais dos grupos tratados foram privados de água por 18 h para melhor evidência de LRA. Os animais de ambos os grupos de tratamento (GWT e GB2KO) foram levemente sedados com uma injeção intraperitoneal de solução de cetamina-xilazina (150 µL, Vetnil, Brasil; a 10 µL/g, Vetbrands Brasil, Brasil), e receberam uma injeção i.m. injeção de solução de glicerol (50% v/v, Merk, Brasil, 7 mL/kg), com meia dose em cada músculo gastrocnêmio. Em seguida, os animais foram recolocados em suas gaiolas em ambiente aquecido até a recuperação.

As amostras de urina foram colocadas em tubos de 2 mL e armazenadas a -20 °C até a análise. Em seguida, 48 h após as injeções, os animais foram anestesiados com injeção i.p. solução de cetamina-xilazina (300 µL a 10 µL/g), e amostras de sangue foram coletadas por punção intracardíaca em tubos não heparinizados de 1,5 mL. Essas amostras foram incubadas por aproximadamente 20 min à temperatura ambiente e então centrifugadas a 4°C a 4000 rpm por 10 min. O soro foi coletado e armazenado em um tubo de 1,5 mL a -20 °C até a análise. Após a coleta da amostra de sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e cada rim foi retirado, pesado e cortado transversalmente. Uma peça foi colocada em um tubo de 2 mL e imediatamente imersa em nitrogênio líquido e então armazenada a -80 °C

até a análise, enquanto a outra metade foi colocada em um tubo de 2 mL com solução de formaldeído tamponado a 10% por 24 h, em seguida colocada em um novo tubo com solução de etanol a 70% e armazenados até o seccionamento.

## 2.2. Análise da função renal

Para a análise da função renal, medimos os níveis de creatinina sérica (SCr) e os níveis de creatinina urinária (UCr) de acordo com o método descrito por Jaffé com pequenas modificações (Semedo et al., 2009). Resumidamente, desproteinizamos as amostras adicionando 100  $\mu$ L de cada amostra de soro a um tubo de 1,5 mL contendo 200  $\mu$ L de 1,84% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 300  $\mu$ L de tungstato de sódio e misturamos completamente a solução resultante. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos e depois centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi então coletado e colocado em outro tubo de 1,5 mL. Em seguida, 5,28 mL de ácido pícrico foram misturados com 1,32 mL de uma solução de NaOH a 10% em um tubo Falcon de 14 mL. Em seguida, 100  $\mu$ L de ácido pícrico (Labtest Diagnostica SA, Brasil) foram adicionados a 63 poços de uma microplaca ELISA de fundo chato de 96 poços (Cral plast, Brasil), seguido de pipetagem e mistura de 200  $\mu$ L de MilliQ H<sub>2</sub>O (Millipore, Estados Unidos) em triplicata para amostras em branco, 200  $\mu$ L de proteína padrão a 5 mg/mL em triplicata e 200  $\mu$ L de cada amostra desproteinizada em duplicata. A placa foi incubada por 20 min e depois lida em um espectrofotômetro EPOCH (Biotek Instruments Inc., Estados Unidos) a 450 nm. Para medir os níveis de UCr, usamos o mesmo método, mas não desproteinizamos as amostras. Em vez disso, diluímos as amostras (1:125) e multiplicamos os resultados por 25. Os níveis de nitrogênio ureico no sangue (BUN) foram medidos por kit de reação colorimétrica (Labtest diagnostica, Brasil) em espectrofotômetro a 600 nm, seguindo as instruções do fabricante.

## 2.3. Coleta de urina

A urina foi coletada por punção direta na bexiga, para dosagem de creatinina e ureia. A urina foi coletada em tubos de 1,5 mL.

Também quantificamos a proteína total da urina (mg/dL) por ensaio colorimétrico a 660 nm usando o Pierce Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Estados Unidos).

## 2.4. Quantificação da expressão gênica

O RNA total foi extraído usando o método TRIzol Reagent (Invitrogen, Estados Unidos) de tecidos e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram executadas em géis de agarose a 1% para avaliar a integridade das amostras, e as amostras foram então quantificadas usando um nanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc., Estados Unidos). O cDNA de fita simples foi sintetizado para cada amostra, usando transcriptase reversa de MML-V (Promega, Estados Unidos). A qRT-PCR foi realizada utilizando sondas Taqman (Applied Biosystem, Estados Unidos) para expressão gênica de GAPDH, B1R e B2R, e sondas de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real SYBR Green (Applied Biosystem, Estados Unidos) para  $\beta$ -actina (sentido - 5' CTG GCC TCA CTG TCC ACC TT 3', anti-sentido - 5' CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T 3'), TGF- $\beta$ 1 (sentido - 5' TTA GGA AGG ACC TGG GTT GG 3', anti-sentido - 5' AAG TTG GCA TGG TAG CCC TT 3') e IL-1 $\beta$  (sentido - 5' AGG AGA ACC AAG CAA CGA CA 3', anti-sentido - 5' CGT TTT TCC ATC TTC anti-sentido TTT 3'). As placas foram colocadas em um sistema de PCR em tempo real 7500 (Applied Biosystems, Estados Unidos) para leitura. A mudança de dobra foi calculada tomando o  $2^{-\Delta\text{CT}}$  de cada amostra e dividindo-o pela média do grupo do tipo selvagem (WT).

## 2.5. Análise histológica

Cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura foram cortadas das amostras armazenadas em solução de etanol 70% e coradas com HE. As amostras foram analisadas usando um microscópio óptico com aumento de 200 $\times$ . Os critérios utilizados para analisar a lesão tubular nas amostras incluíram descamação do epitélio, restos celulares no lúmen, achatamento do epitélio, presença de cilindros e dilatação do lúmen. Com base nesses critérios, um especialista classificou e pontuou as lesões: grau I (< 10%), grau II (10%-25%), grau III (25-50%) e grau IV (> 50%).

## 2.6. Análise estatística

Os valores são expressos como média  $\pm$  SE. As análises estatísticas foram realizadas por one-way ANOVA (análise de variância) seguida do teste post-hoc de Tukey, e as associações foram feitas pelo teste de correlação de Spearman. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. O software estatístico utilizado para os gráficos e análises foi o GraphPad Prism 5.

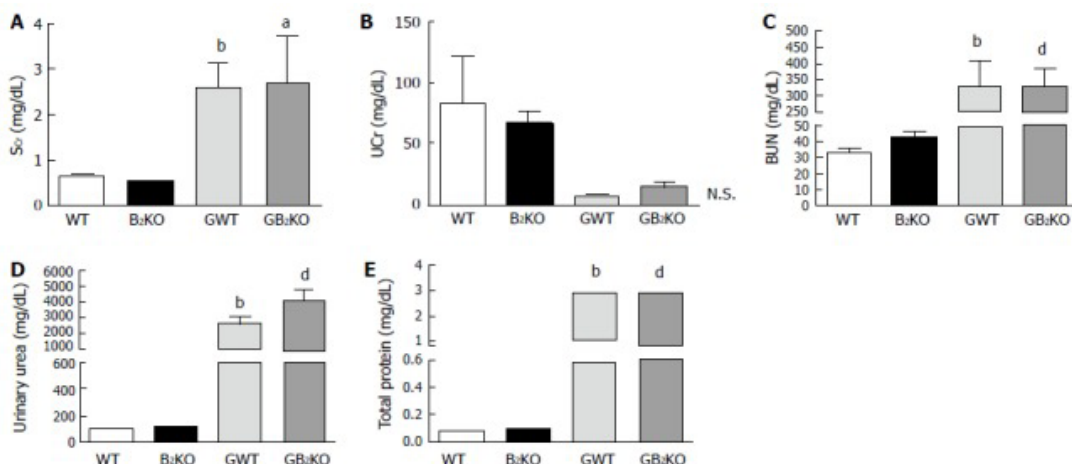


### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Avaliação da função renal

Os níveis de SCr foram diferentes entre o controle tipo selvagem e glicerol, e grupo controle knockout e glicerol, com grupos de glicerol maiores cerca de 4 vezes do que os grupos de controle (Figura 1A). Não houve diferenças significativas nos níveis de Ucr, apesar de o tipo selvagem apresentar níveis cerca de 11 vezes maiores do que o grupo de tipo selvagem de glicerol (Figura 1B). Os níveis de BUN foram diferentes cerca de 10 vezes entre o controle do tipo selvagem e o glicerol, e cerca de 8 vezes entre os camundongos nocautes de controle e o glicerol (Figura 1C). O conteúdo de ureia urinária diferiu entre os grupos controle e glicerol, cerca de 24 vezes para grupos de tipo selvagem e cerca de 33 vezes para grupos knockout (Figura 1D). Os níveis de proteínas totais na urina foram diferentes entre o grupo selvagem e glicerol (cerca de 42 vezes), enquanto a diferença entre o grupo knockout e glicerol foi de aproximadamente 36 vezes. Não houve diferença entre o glicerol de tipo selvagem e o grupo de glicerol nocaute (Figura 1E).

**Figura 1.** Parâmetros séricos e urinários.

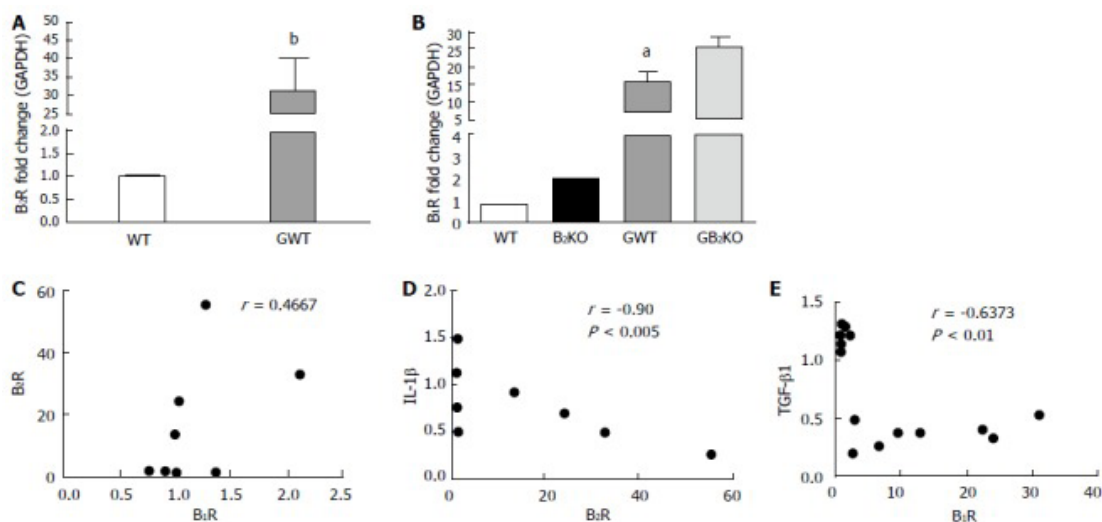


A: níveis de SCr (aP < 0,05 vs B2KO, bP < 0,01 vs WT); B: Níveis de Ucr; C: Níveis de BUN (bP < 0,005 vs WT, dP < 0,01 vs B2KO); D: Uréia urinária (bP < 0,01 vs WT, dP < 0,005 vs B2KO); E: Proteínas urinárias totais (bP < 0,005 vs WT, dP < 0,005 vs B2KO). WT: Tipo selvagem; B2KO: Camundongos knockout para receptor de cinina B2; GWT: Glicerol tipo selvagem; B2KO: Camundongos knockout para o receptor B2 de cinina de glicerol; BUN: Nitrogênio ureico no sangue.

### 3.2. Avaliação da expressão gênica

As mudanças na expressão renal de B1R, B2R,  $\beta$ -actina, IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$ 1 são mostradas na Figura 2.2. Também são mostradas as associações entre esses níveis de expressão. A mudança de dobra do B2R foi diferente entre os grupos de controle e glicerol cerca de 30 vezes (Figura (Figura 2A)). A mudança de dobra B1R foi diferente entre os grupos de controle e glicerol cerca de 14 vezes, e entre os grupos de glicerol quase 2 vezes (Figura 2B). As associações não foram diferentes entre B1R e B2R (Figura 2C), mas mostraram diferença entre B2R e IL-1 $\beta$ , onde maior expressão de B2R resulta em menor expressão de IL-1 $\beta$  (Figura(Figura2D)), e entre os grupos B1R e TGF- $\beta$ 1, com maior expressão de B1R quando a expressão de TGF- $\beta$ 1 é menor (Figura 2E).

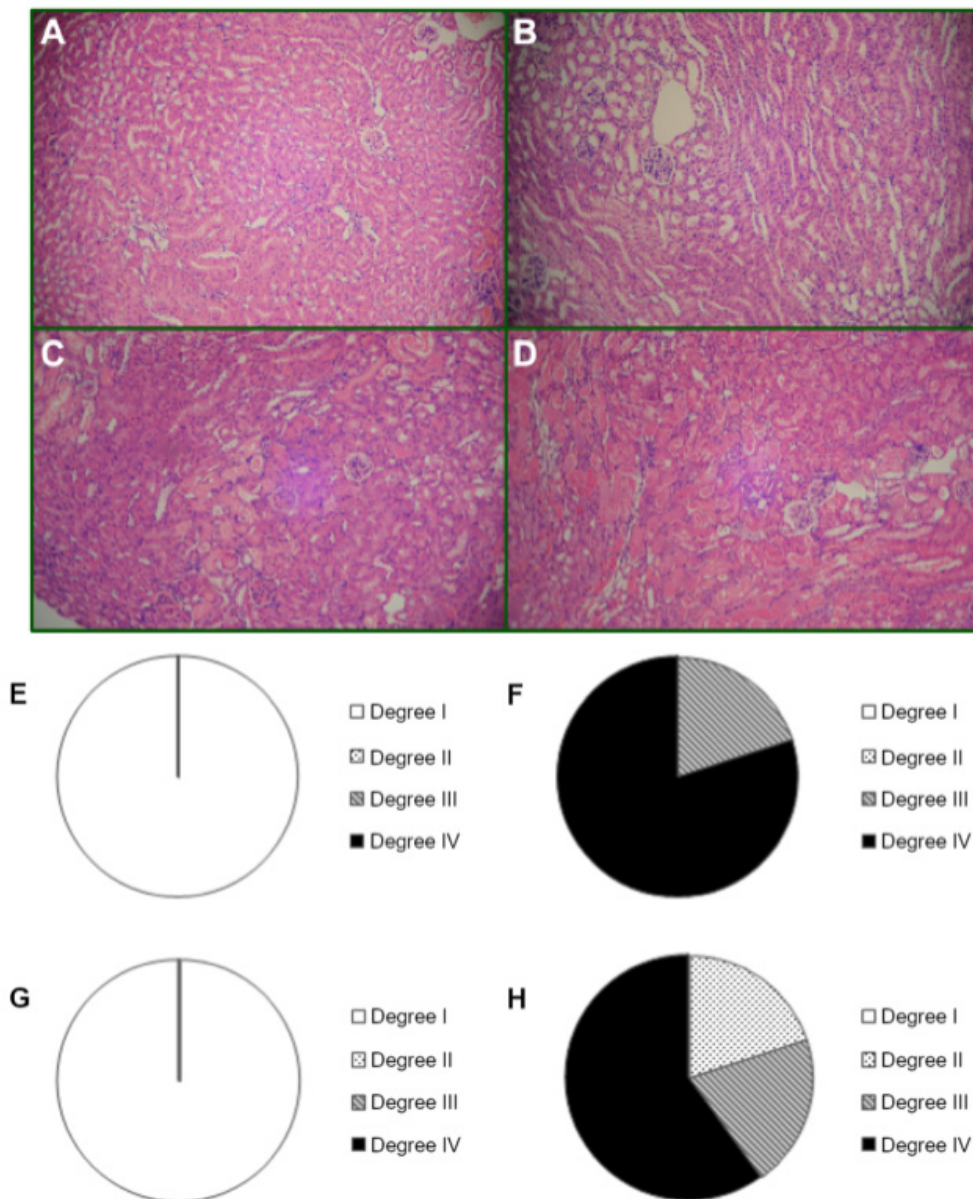
**Figura 2.** Expressão gênica renal e associação entre genes.



A: mudança de dobra B2R (bP < 0,01 vs WT); B: mudança de dobra de B1R (aP < 0,05 vs B2KO); C: Associação entre B2R e B1R; D: Associação entre IL-1 $\beta$  e B1R; E: Associação entre TGF- $\beta$ 1 e B1R. WT: Tipo selvagem; B2KO: Camundongos knockout para receptor de cinina B2; GWT: Glicerol tipo selvagem; GB2KO: Camundongos knockout para receptor B2 de cinina de glicerol; BUN: Nitrogênio ureico no sangue.

### 3.3. Avaliação histológica e histomorfometria

A avaliação histológica e a histomorfometria mostradas na Figura 3 demonstram que ambos os conjuntos de animais (WT e B2KO) tiveram um alto grau de lesão tubular quando injetados com glicerol (Figura 3F e H), mas WT teve um grau IV maior em comparação com B2KO.



**Figura 3.** A avaliação histológica e os gráficos mostram os graus de lesão renal. A: Grau I; B: Grau II; C: Grau III; D: Grau IV; E: WT; F: GWT; G: B2KO; H: GB2KO. WT: Tipo selvagem; B2KO: Camundongos knockout para receptor de cinina B2; GWT: Glicerol tipo selvagem; GB2KO: Camundongos knockout para receptor B2 de cininas de glicerol;

#### 4. DISCUSSÃO

Descreve-se que os níveis de NO caem na rbdomiólise (Bosch et al., 2009), e que a ativação de B2R está relacionada com a produção de NO (Kon e Hunley, 2007) consideramos

investigar o papel do receptor B2 de cininas no modelo de rabdomiólise induzida por glicerol.

Nossos achados demonstram que a expressão renal de B2R em animais que receberam glicerol é 30 vezes maior que a dos controles. Outro estudo mostrou um aumento de 5 vezes na expressão de B2R (Wang et al., 2008). Esses resultados sugerem que o B2R pode estar envolvido no processo inflamatório renal. Curiosamente, o pico de expressão renal de B2R coincidiu com uma redução significativa na função renal, o que poderia sugerir que a suprarregulação renal desses receptores ocorre em resposta à lesão renal.

A função renal foi avaliada medindo-se os níveis séricos de creatinina e BUN. Em camundongos, particularmente camundongos C57Bl/6 machos, o nível normal de creatinina sérica (SCr) é de aproximadamente  $0,8 \pm 0,1$  mg/dL (Schnell et al., 2002), que é semelhante aos valores encontrados nos grupos de controle (Tabela 1). Em estudo recente (Korrapati et al., 2012), os autores mostraram, utilizando o modelo de glicerol em ratos, que o pico de comprometimento da função renal ocorre entre 48 e 72 h, conforme evidenciado pelos níveis de SCr. Em nosso estudo, investigamos o pico de lesão.

**Tabela 1.** Creatinina sérica e urinária  
Grupos

Variável	WT	B2KO	GWT	GB2KO
SCr	$0.6621 \pm 0.041$	$0.5584 \pm 0.027$	$2.613 \pm 0.536^b$	$2.233 \pm 0.867^a$
UCr	$50.31 \pm 29.24$	$32.80 \pm 15.44$	$4.540 \pm 2.137$	$9.084 \pm 3.931$

a -  $P < 0,05$  vs B2KO; b -  $P < 0,01$  vs WT. B2KO: Camundongos knockout para receptor B2 de cininas; WT: Tipo selvagem; GWT: Tipo selvagem com glicerol; GB2KO: Camundongos knockout para o receptor B2 de cininas com glicerol.

A lesão renal no modelo de glicerol é devido à liberação de moléculas e proteínas nefrotóxicas (por exemplo, mioglobina) na corrente sanguínea, causando danos ao atingir o rim (Bosch et al., 2009). A literatura descreve, utilizando modelos de rato e cultura de células (Balla et al., 1991; Beetham, 2000; Nath et al., 1998; Plotnikov et al., 2009; Shah et al., 1988; Zager e Burkhart, 1997), o papel deletério dessa proteína, especificamente do grupo prostético heme, no endotélio tubular. Esse papel está associado à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres nas mitocôndrias, que iniciam reações de peroxidação lipídica.

Foi demonstrado que o músculo esquelético humano pode sobreviver por até 3 ou 4 h durante a isquemia circulatória (Tomita et al., 2012). Em outros estudos (Nath et al., 1998), os autores mostraram que no modelo de rabdomiólise induzida por glicerol em ratos, as

mitocôndrias renais já estavam marcadamente degeneradas 3 h após a aplicação de glicerol. Vinte e quatro horas após o tratamento, havia sinais claros de necrose tubular (proximal e distal). Os autores atribuíram isso à formação de agregados intratubulares. Esta conclusão sugere que a ruptura do músculo esquelético pode ocorrer aproximadamente 3 h após a administração de glicerol.

Estudos recentes (Tomita et al., 2012; Kakoki et al., 2004; Kakoki et al., 2007; Kakoki et al., 2010) mostram que a deleção de B1R e B2R exacerba o fenótipo renal em modelos de camundongos diabéticos, sugerindo que ambos os receptores têm um efeito protetor na nefropatia diabética por suprimir o estresse oxidativo via NO e prostaglandinas. No entanto, como a ausência de um dos receptores causa aumento da expressão do outro, é difícil determinar a função precisa de cada receptor (Tomita et al., 2012). Em outros modelos, como o modelo I/R (Wang et al., 2008), o papel dos receptores também foi estudado. O bloqueio de B1R mostrou um efeito antifibrótico, que, portanto, tem um efeito protetor. Alguns autores (Chiang et al., 2006) demonstraram que a lesão renal por isquemia e reperfusão é significativamente aumentada pela ativação do B2R e que essa ativação está relacionada ao aumento da produção de EROs, sugerindo que a ativação do B2R é deletéria.

Os receptores de cininas no tecido renal foram estudados no modelo I/R, onde foi demonstrado que ambos os receptores têm papel protetor neste tipo de lesão (Kakoki et al., 2007). No entanto, um estudo diferente (Wang et al., 2008) descobriu que durante I/R em camundongos, o duplo knockout mostrou uma SCr extremamente alta junto com um perfil pró-inflamatório. A expressão renal de B2R se alternou, iniciando com baixa expressão após 4 h, alta expressão após 24 h e 48 h após o início da reperfusão, seu nível de expressão foi semelhante ao observado em 4 h e depois aumentou para valores semelhantes aos observados em 24 h pós-reperfusão.

Uma diferença importante entre os dois estudos anteriores (Wang et al., 2008; Nath et al., 1998) e o nosso é que nos outros estudos, isquemia e reperfusão foram induzidas exclusivamente nos rins, enquanto em nosso trabalho, a lesão renal nefrotóxica ocorre após a indução da lesão primária do músculo esquelético. Além disso, no modelo que utilizamos, não há tempo para ocorrer a reperfusão, pois o pico da lesão seria 48 h depois, permitindo assim que os rins permanecessem em estado isquêmico.

Em relação à liberação de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1 $\beta$ ) e fatores de crescimento com efeito pró-fibrótico conhecido (TGF- $\beta$ 1), alguns autores (Korrapati et al., 2012) mostraram que no modelo de glicerol em ratos, os níveis de expressão de mRNA do pico de IL-1 $\beta$  48 h após o tratamento, enquanto em nosso trabalho, os mesmos níveis de expressão foram observados nos animais GB2KO, enquanto os animais GWT apresentaram níveis de expressão semelhantes aos encontrados 24 h pós-tratamento por esses autores. Em



nosso estudo, encontramos uma forte associação negativa entre a expressão de B2R e IL-1 $\beta$ , o que pode indicar que B2R não induz inflamação nos rins.

Estudos anteriores mostram (Korrapati et al., 2012) que a expressão renal de TGF- $\beta$ 1 48 h após a injeção im de glicerol em camundongos é 1,5 vezes maior do que nossos resultados indicam. É importante notar que a linhagem dos animais utilizados foi diferente e que o gene endógeno estudado também foi diferente. Além disso, em nosso trabalho, não encontramos associação entre a expressão renal de B2R e TGF- $\beta$ 1 (dados não apresentados). Enquanto isso, B1R e TGF- $\beta$ 1 tiveram uma forte associação negativa.

Outra questão importante na análise da expressão do TGF- $\beta$ 1 é a diferença metodológica entre os estudos. Embora ambos os estudos utilizem roedores, ratos e camundongos apresentam diferenças em vários genes, incluindo TGF- $\beta$ 1; a versão de rato está no cromossomo 1, enquanto a versão murina está localizada no cromossomo 7.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o B2R não tem um papel renoprotetor em camundongos com rhabdomiólise induzida por glicerol.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM CE, NOGUEIRA E, ALMEIDA SS, GOMES PP, BACURAU RF, OZAKI KS, CENEDEZE MA, SILVA FILHO AP, CÂMARA NO, ARAUJO RC. Clinical impact of an angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion and kinin B2 receptor +9/-9 polymorphisms in the prognosis of renal transplantation. **Biol Chem**. 2013; 394:369–377.
- ARAÚJO RC, MORI MA, MERINO VF, BASCANDS JL, SCHANSTRA JP, ZOLLNER RL, VILLELA CA, NAKAIE CR, PAIVA AC, PESQUERO JL et al. Role of the kinin B1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. **Biol Chem**. 2006;387:431–436.
- BALLA G, VERCELLOTTI GM, MULLER-EBERHARD U, EATON J, JACOB HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. **Lab Invest**. 1991;64:648–655.
- BARROS CC, HARO A, RUSSO FJ, SCHADOCK I, ALMEIDA SS, REIS FC, MORAES MR, HAIDAR A, HIRATA AE, MORI M et al. Bradykinin inhibits hepatic gluconeogenesis in obese mice. **Lab Invest**. 2012; 92:1419–1427.
- BEETHAM R. Biochemical investigation of suspected rhabdomyolysis. **Ann Clin Biochem**. 2000;37(Pt 5):581–587.
- BHOOLA KD, FIGUEROA CD, WORTHY K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev**. 1992;44:1–80.
- BOSCH X, POCH E, GRAU JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. **N Engl J Med**. 2009;361:62–72.
- CANTERAS NS. Neural basis of motivated behaviors and emotions. In: Aires MM, editor. **Physiology**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p. 355.
- CHIANG WC, CHIEN CT, LIN WW, LIN SL, CHEN YM, LAI CF, WU KD, CHAO J, TSAI TJ. Early activation of bradykinin B2 receptor aggravates reactive oxygen species generation and renal damage in ischemia/reperfusion injury. **Free Radic Biol Med**. 2006;41:1304–1314.
- COSTA-NETO CM, DILLENBURG-PILLA P, HEINRICH TA, PARREIRAS-E-SILVA LT, PEREIRA MG, REIS RI, SOUZA PP. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. **Int Immunopharmacol**. 2008; 8:135–142.
- HEUNG M, CHAWLA LS. Predicting progression to chronic kidney disease after recovery from acute kidney injury. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. 2012; 21:628–634.

- KAKOKI M, TAKAHASHI N, JENNETTE JC, SMITHIES O. Diabetic nephropathy is markedly enhanced in mice lacking the bradykinin B2 receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2004; 101:13302–13305.
- KAKOKI M, MCGARRAH RW, KIM HS, SMITHIES O. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2007; 104:7576–7581.
- KAKOKI M, SULLIVAN KA, BACKUS C, HAYES JM, OH SS, HUA K, GASIM AM, TOMITA H, GRANT R, NOSSOV SB et al. Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2010; 107:10190–10195.
- KLEIN J, BUFFIN-MEYER B, SCHANSTRA JP. The role of the renal kallikrein-kinin system in physiology and pathology. In: Bader M, editor. **Kinins**. Berlin: DeGruyter; 2011. pp. 103–110.
- KON V, HUNLEY TE. Kinins and Endothelin. In: Alpern RJ, Hebert SC, editors. **Seldin and Giebisch's The Kidney: Physiology and Pathophysiology**. Manhattan: Elsevier/Academic Press; 2007. pp. 385–396.
- KORRAPATI MC, SHANER BE, SCHNELLMANN RG. Recovery from glycerol-induced acute kidney injury is accelerated by suramin. **J Pharmacol Exp Ther**. 2012; 341:126–136.
- MARCEAU F, HESS JF, BACHVAROV DR. The B1 receptors for kinins. **Pharmacol Rev**. 1998; 50:357–386.
- NAICKER S, NAIDOO S, RAMSAROOOP R, MOODLEY D, BHOOLA K. Tissue kallikrein and kinins in renal disease. **Immunopharmacology**. 1999; 44:183–192.
- NATH KA, GRANDE JP, CROATT AJ, LIKELY S, HEBBEL RP, ENRIGHT H. Intracellular targets in heme protein-induced renal injury. **Kidney Int**. 1998; 53:100–111.
- PLOTNIKOV EY, CHUPYRKINA AA, PEVZNER IB, ISAEV NK, ZOROV DB. Myoglobin causes oxidative stress, increase of NO production and dysfunction of kidney's mitochondria. **Biochim Biophys Acta**. 2009; 1792:796–803.
- REGOLI D, BARABÉ J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Rev**. 1980; 32:1–46.
- SANOFF S, OKUSA MD. Impact of acute kidney injury on chronic kidney disease and its progression. **Contrib Nephrol**. 2011; 171:213–217.
- SCHNELL MA, HARDY C, HAWLEY M, PROPERT KJ, WILSON JM. Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters. **Hum Gene Ther**. 2002; 13:155–161.
- SCICLI AG, CARRETERO OA. Renal kallikrein-kinin system. **Kidney Int**. 1986; 29:120–130.
- WANG PH, CAMPANHOLLE G, CENEDEZE MA, FEITOZA CQ, GONÇALVES GM, LANDGRAF RG, JANCAR S, PESQUERO JB, PACHECO-SILVA A, CÂMARA NO. Bradykinin [corrected] B1 receptor antagonism is beneficial in renal ischemia-reperfusion injury. **PLoS One**. 2008;3: e3050.
- SEMEDO P, CORREA-COSTA M, ANTONIO CENEDEZE M, MARIA AVANCINI COSTA MALHEIROS D, ANTONIA DOS REIS M, SHIMIZU MH, SEGURO AC, PACHECO-SILVA A, SARAIVA CAMARA NO. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. **Stem Cells**. 2009; 27:3063–3073.
- SHAH SV, WALKER PD. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure. **Am J Physiol**. 1988;255: F438–F443.
- SONG Q, WANG DZ, HARLEY RA, CHAO L, CHAO J. Cellular localization of low-molecular-weight kininogen and bradykinin B2 receptor mRNAs in human kidney. **Am J Physiol**. 1996;270: F919–F926.
- TOMITA H, SANFORD RB, SMITHIES O, KAKOKI M. The kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy. **Kidney Int**. 2012; 81:733–744.
- ZAGER RA, BURKHART K. Myoglobin toxicity in proximal human kidney cells: roles of Fe, Ca<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and terminal mitochondrial electron transport. **Kidney Int**. 1997; 51:728–738.

## THE KININ B2 RECEPTOR DOES NOT EXERT RENOPROTECTIVE EFFECTS IN A MODEL OF RHABDOMYOLYSIS INDUCED BY GLYCEROL IN MICE

### Abstract

We investigated protective role of B2 kinin receptor in mice model of glycerol-induced rhabdomyolysis. Male C57Bl/6 mice (n=28) were separated into 4 groups: untreated WT animals, untreated B2 knockout mice, WT treated with glycerol and B2 knockout mice treated with glycerol. Glycerol-treated animals received an intramuscular injection of glycerol solution (50% v/v, 7 mL/kg). After 48 h, urine and blood samples were collected for creatinine and urea. Additionally, kidney samples were extracted for histological evaluation, and mRNA expression levels of kinin B1 and B2 receptors and inflammatory mediators were measured by real-time polymerase chain reaction. Serum creatinine and urea levels showed differences between untreated and glycerol-treated wild-type mice ( $0.66 \pm 0.04$  vs  $2.61 \pm 0.53$  mg/dL,  $P < 0.01$ ; and  $33.51 \pm 2.08$  vs  $330.2 \pm 77.7$  mg/dL,  $P < 0.005$ ), and between untreated B2 knockout mice and glycerol-treated knockout mice ( $0.56 \pm 0.03$  vs  $2.23 \pm 0.87$  mg/dL,  $P < 0.05$ ; and  $42.49 \pm 3.2$  vs  $327.2 \pm 58.4$  mg/dL,  $P < 0.01$ ), but there was no difference between glycerol-treated groups. Glycerol was able to induce increase in kinin B2 receptor expression ( $> 30$ -fold,  $31.34 \pm 8.9$ ) in kidney. Glycerol-injected animals showed a greater degree of tubular damage than untreated animals. WT and knockout mice treated with glycerol showed renal injury, with impaired renal function. However, glycerol-treated B2 knockout mice did not show a different phenotype in markers of renal injury when compared to wild-type glycerol-treated group. We conclude that B2 kinin receptor has no protective role in kidney injury.

**Keywords:** Kinins, Acute kidney injury, Animal models, Rhabdomyolysis, Skeletal muscle

# CAPÍTULO 2

## ASPECTOS MOLECULARES ASSOCIADOS À CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA E À REATIVAÇÃO DA INFECÇÃO EM PACIENTES CARDIOPATAS TRANSPLANTADOS

**Priscilla Almeida da Costa**

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais

<http://lattes.cnpq.br/0924585090200291>

**Andréa Mara Macedo**

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais

### RESUMO

Transplante cardíaco é opção terapêutica considerada no estágio avançado da cardiomiopatia chagásica. Contudo, após transplante, o diagnóstico diferencial de rejeição versus reativação chagásica tem sido considerado difícil, dificultando o tratamento correto. O motivo pelo qual alguns pacientes chagásicos apresentam reativação da doença pós-transplante é desconhecido. Estima-se que há fatores relacionados à variabilidade genética do parasito. Então, investigamos a possibilidade de utilização de PCRs direcionadas para marcadores nucleares (rDNA 24S $\alpha$ ) e mitocondriais (kDNA) para detecção do *Trypanosoma cruzi* em corações de pacientes chagásicos transplantados; assim como, a ocorrência de subpopulações de *T. cruzi* mais associadas à reativação da infecção, utilizando um triplo ensaio para determinação de DTUs (marcadores para

COII, espaçador intergênico do miniéxon, rDNA 24S $\alpha$ ). Foram analisadas 991 biópsias endomiocárdicas (BEMs), derivadas de 98 pacientes, 14 biópsias de pele e três de sistema nervoso central (SNC). DNA de *T. cruzi* foi detectado em 205 BEMs (70 pacientes), oito biópsias de pele e três de SNC. Comparada às outras técnicas de diagnóstico utilizadas, PCR revelou sensibilidade superior, com boa especificidade, podendo antecipar a reativação clínica da doença de Chagas entre 1,5 e 36 meses (média 9,1 meses), contribuindo para o diagnóstico precoce. A maioria dos pacientes teve reativação por TcII, corroborando com a ideia de que esta é a principal DTU associada com a forma cardíaca da doença de Chagas, pelo menos nesta região geográfica.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, transplante de coração, reativação chagásica, biópsia endomiocárdica, diagnóstico molecular, reação em cadeia da polimerase, PCR.

### 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Mesmo tendo sido descoberta há mais de 100 anos, essa doença ainda representa um sério problema de saúde pública em 21 países da América Latina, onde estima-se

que 5,7 milhões de pessoas estão infectadas (1,2 milhões no Brasil) (WHO 2010; 2015).

Por conseguinte, a doença de Chagas ainda é uma parasitose de significativa morbidade e mortalidade. Cerca de 25-30% dos infectados evoluem para a forma mais grave da doença — forma cardíaca —, levando à morte de 12.000 indivíduos por ano, com 6.000 apenas no Brasil (Martins-Melo *et al.*, 2014). A insuficiência cardíaca é a principal causa de morte em decorrência de complicações da doença de Chagas, e embora no passado o paciente cardiopata chagásico fosse considerado contraindicado para o transplante cardíaco, atualmente, este é um procedimento de rotina para tratamento de pacientes chagásicos com insuficiência cardíaca em fase terminal, tornando-se a terceira principal indicação para o transplante cardíaco no país (Bocchi *et al.*, 1996; 2001a).

É preciso reconhecer que um marco importante para o sucesso do transplante de órgãos no mundo foi a introdução de drogas imunossupressoras. Todavia, o tratamento imunossupressor, que é essencial no período pós-cirúrgico para controlar a rejeição do órgão transplantado, leva ao comprometimento das defesas imunológicas do organismo, podendo aumentar a probabilidade de infecções, incluindo a reativação da doença de Chagas (Schijman, *et al.*, 2000; Souza *et al.* 2001; Bestetti *et al.* 2007).

Dados diversos demonstram que a maior incidência de reativação da doença de Chagas em pacientes transplantados ocorre no primeiro ano pós-transplante, quando a imunossupressão está mais acentuada para prevenção de rejeição (Dinardi *et al.*, 2012). Em geral, cerca de 30 a 90% dos pacientes chagásicos apresentam pelo menos um episódio de reativação após o transplante (Bocchi *et al.*, 1996; Souza *et al.*, 2001; Bestetti *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2017), sendo o número médio de episódios ao longo da vida de aproximadamente 2,5 por paciente (Revisado por Machado *et al.*, 2012). Apesar da frequente reativação da infecção, esta raramente constitui causa de óbito, e, em longo prazo, a sobrevida dos pacientes chagásicos transplantados é considerada muito boa (Bocchi *et al.*, 2001b).

A reativação da infecção pelo *T. cruzi* em pacientes transplantados pode ocorrer em qualquer tecido do organismo, sendo, em geral, mais frequente no coração, tecido subcutâneo, cérebro, sangue e outros (Bacal *et al.*, 2010; Marchiori *et al.*, 2007). A reativação clínica, por sua vez, pode apresentar manifestações cardíacas como miocardite, disfunção ventricular, arritmias, bloqueios atrioventriculares ou intraventriculares no eletrocardiograma e/ou manifestações extracardíacas como lesões cutâneas, febre, acometimento de medula óssea ou ocorrências neurológicas (Bacal *et al.*, 2018).

Dessa forma, após o transplante cardíaco, é necessária a monitoração continuada dos pacientes, por meio de visitas ambulatoriais, ecocardiograma, eletrocardiograma, radiografia de tórax, dosagem de inibidor de calcineurina, dosagem de eletrólitos, enzimas hepáticas,



hemograma e biópsias endomiocárdicas (Bacal *et al.*, 2009). No caso dos pacientes chagásicos, também é realizada a monitoração laboratorial afim de se identificar qualquer sinal subclínico de reativação chagásica, antes do estabelecimento das manifestações clínicas (Andrade *et al.*, 2011). Para isso, utilizam-se, geralmente, os métodos parasitológicos — pesquisa direta de tripomastigotas sanguíneos e hemocultura — e histológicos — procura de amastigotas nas biópsias —, apesar destes serem testes com alta especificidade, mas com baixa sensibilidade (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda, 2003; Gomes *et al.*, 2009).

A biópsia endomiocárdica (BEM) é considerada o método de rastreio padrão-ouro na detecção da rejeição e reativação chagásica após o transplante cardíaco. Quando é verificada a presença de ninhos de amastigotas durante a análise histopatológica da BEM, o diagnóstico de reativação chagásica é afirmado. Todavia, o diagnóstico diferencial entre rejeição aguda celular e reativação chagásica ainda é considerado um desafio, pois o infiltrado inflamatório em ambas as situações é morfológicamente indistinguível e as formas intracelulares do parasito, por serem escassas, raramente são encontradas (Andrade *et al.*, 2011, Benvenuti *et al.*, 2005). Dessa forma, permanece o risco de que a miocardite chagásica possa ser equivocadamente diagnosticada como rejeição do enxerto e ser tratada com intensificação do tratamento imunossupressor, ao invés de terapia específica contra *T. cruzi*, agravando a reativação.

Nesse cenário, a detecção do *T. cruzi* em tecidos de pacientes chagásicos crônicos, por meio de técnicas de biologia molecular, se apresenta como uma estratégia promissora para estabelecer o diagnóstico das infecções pelo *T. cruzi*. Assim, PCRs baseadas em diferentes abordagens, que visam amplificar o DNA do cinetoplasto (kDNA), o DNA nuclear ou DNA satélite, têm sido utilizadas com êxito para diagnosticar a infecção por *T. cruzi* (Diez *et al.*, 2007; Brasil *et al.*, 2010; Schijman *et al.*, 2011). Além disso, a técnica de PCR tem mostrado alta sensibilidade associada a razoável especificidade (Luquetti & Rassi, 2000).

Entretanto, embora a utilização de técnicas moleculares para detecção do parasito no sangue periférico e no miocárdio dos pacientes transplantados venha sendo considerada, a maior parte dos trabalhos foi realizada com um número pequeno de amostras e em curto período de acompanhamento, de forma que a sensibilidade e especificidade dos métodos utilizados ainda não puderam ser adequadamente avaliadas (Maldonado *et al.*, 2004, Diez *et al.*, 2007, Benvenuti *et al.*, 2011).

Um outro ponto a evidenciar, é que os fatores que determinam as diferentes manifestações clínicas e os que levam às formas leve ou grave da doença ainda não estão completamente esclarecidos, assim como é desconhecido o motivo pelo qual alguns pacientes chagásicos, submetidos ao transplante cardíaco, apresentam reativação da doença e outros não. Estima-se que haja uma contribuição relevante atribuída aos aspectos genéticos tanto do

parasito quanto do hospedeiro (Macedo & Pena, 1998). Em relação ao parasito, sabe-se que o *T. cruzi* exibe alto grau de polimorfismo intraespecífico, incluindo desde aspectos morfológicos até refinados marcadores moleculares.

Conseqüentemente, ao longo dos anos, várias abordagens foram utilizadas para caracterizar a estrutura da população de *T. cruzi*, definindo diversos subgrupos no táxon, o que complicou bastante a comparação de resultados obtidos por diferentes laboratórios. Assim, em 2009, durante o simpósio comemorativo do centenário da descoberta da doença de Chagas, foi oficializada a subdivisão da espécie *T. cruzi* em seis unidades discretas de tipagem (do inglês *discrete typing units* - DTUs). Por conseguinte, desde a revisão da nomenclatura das DTUs, vários métodos têm sido relatados para a caracterização e genotipagem de populações de *T. cruzi*.

Uma DTU é definida como um conjunto de isolados geneticamente semelhantes que podem ser identificados por marcadores moleculares e imunológicos comuns (Zingales *et al.*, 2009), podendo apresentar distribuição diferencial em vetores, hospedeiros definitivos e ciclos de transmissão (Zingales *et al.*, 2011).

É importante ainda citar que a grande diversidade genética entre as DTUs de *T. cruzi* tem profundo impacto sobre as características biológicas, clínicas e epidemiológicas da doença de Chagas (Revisado por Tibayrenc *et al.*, 2010). Por isso, uma das questões mais intrigantes na doença de Chagas continua sendo a variação na prevalência e na severidade das diferentes formas clínicas dessa infecção em diversas regiões endêmicas (Zingales *et al.*, 2011)

Nesse cenário, decidimos, no presente trabalho, buscar o desenvolvimento e o aprimoramento de ferramentas moleculares para a detecção e genotipagem do *T. cruzi* em amostras biológicas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, foi realizada a análise de 991 BEMs oriundas do monitoramento de 98 pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica, que foram submetidos a transplante cardíaco no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), no período entre 2008 e 2018.

Conforme mencionado anteriormente, a BEM é considerada padrão-ouro para a vigilância da rejeição do enxerto cardíaco. Assim, após o transplante, os pacientes foram submetidos a procedimentos periódicos para coletas de BEMs, conforme as bases de protocolo de vigilância de rejeição: semanais no primeiro mês após o transplante, quinzenais no segundo mês, mensais até o sexto mês e, a seguir trimestrais até completar um ano de transplante.

Além disso, este procedimento foi adicionalmente realizado sempre que houve suspeita clínica de rejeição ou reativação da doença de Chagas (Bacal *et al.*, 2009). Na presença de lesões cutâneas ou manifestações neurológicas pós-transplante, também foram realizadas análises histopatológicas de biópsias de pele ou medula, respectivamente.

Para o diagnóstico de reativação chagásica, foram considerados os sinais clínicos, laboratoriais e histológicos, tais como lesões cutâneas (nódulos subcutâneos, paniculite, entre outros), manifestação neurológica, disfunção ventricular, arritmias, bloqueios atrioventriculares/ intraventriculares, parasitemia e/ou ninhos de amastigotas nos tecidos biológicos, seguindo as recomendações da Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco (Bacal *et al.*, 2018).

Como parte do protocolo para prevenção de rejeição do enxerto, os pacientes receberam preferencialmente tratamento com ciclosporina ou tacrolimus, micofenolato mofetil e prednisona. Além disso, nenhuma terapia profilática anti-*T. cruzi*, pré ou pós-transplante, foi administrada aos pacientes. O tratamento com benzonidazol, na dose de 5 a 10mg/kg/dia, durante 60 dias, foi instituído apenas para os pacientes que tiveram diagnóstico confirmado de reativação da doença de Chagas.

Os pacientes participantes do presente estudo assinaram termo de consentimento livre esclarecido. Os objetivos e procedimentos constantes deste projeto foram submetidos e aprovados pelo CONEP (1570/2002) e COEP/UFMG (0564/2011).

## 2.1. Preparação do DNA genômico do *T. cruzi*

A extração do DNA de amostras embebidas em parafina ou conservadas em etanol foi realizada utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Valencia, CA) ou o kit QIAamp DNA MINI KIT (Qiagen, Valencia, CA), respectivamente. No caso das amostras parafinadas, para a extração de DNA foram realizadas 5 a 12 secções de 10 µm de espessura nos blocos. No caso das amostras conservadas em etanol, todo o fragmento da BEM foi utilizado.

## 2.2. PCR para controle da extração do DNA

Para o controle do procedimento e verificação da integridade do DNA extraído, foi realizada a amplificação de uma região polimórfica do DNA humano, utilizando os iniciadores MID-768-F e MID-768-R (Quadro 1) conforme descrito por Weber *et al.*, 2002. DNA extraído de pool humano foi utilizado como controle positivo e reagentes da PCR, sem adição de DNA, constituíram o controle negativo.

### 2.3. PCR kDNA

Para a detecção do DNA do *T. cruzi* foi realizada a amplificação específica do fragmento de 330 pb correspondente à região variável do minicírculo do kDNA empregando os iniciadores S35 e S36 (Quadro 1) (Wincker *et al.*, 1994). Os produtos da amplificação foram visualizados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata, de acordo com o protocolo descrito por Santos *et al.*, 1993. DNA da cepa JG de *T. cruzi* foi incluído como controle positivo e componentes das reações de PCR, sem adição de DNA, como controle negativo.

### 2.4. PCR em tempo real do gene rDNA 24S $\alpha$

A amplificação do gene do rDNA foi realizada por meio de uma *hemi nested* PCR, como preconizada por Freitas *et al.*, 2005. A primeira etapa de amplificação foi realizada usando os iniciadores D75 e D72 (Quadro 1) e 5 $\mu$ L da solução contendo o DNA extraído (Souto *et al.*, 1993). As reações da segunda etapa de amplificação foram realizadas em aparelho de PCR em tempo real (ABI7900-Applied Biosystems) utilizando SYBR Green<sup>®</sup> PCR Master Mix Master (Applied Biosystems), com os iniciadores D71 e D72 (Quadro 1), e 2 $\mu$ L do produto da primeira PCR como molde, seguido por identificação dos produtos a partir de curvas de dissociação (Freitas *et al.*, 2005). Os controles positivos utilizados foram DNA de *T. cruzi* das DTUs I e II, constituídos pelo clone Col 1.7G2 (TM ~ 81°C) e cepa JG (TM ~ 76°C), respectivamente. Já os controles negativos foram formados pelos componentes da PCR, sem adição de DNA.

### 2.5. Métodos utilizados para a caracterização das subpopulações de *T. cruzi*

Todas as 205 BEMs (sendo 153 amostras frescas e 52 amostras fixadas e parafinadas) que apresentaram resultado positivo para pelo menos uma das PCRs utilizadas para o diagnóstico foram incluídas nesta parte do projeto para a caracterização do *T. cruzi* presente nas amostras. Adicionalmente, foram também analisadas as oito biópsias de pele e três biópsias do SNC positivas para presença de DNA do parasito. Para isso, foi utilizado o triplo ensaio sequencial, adaptado de D'Avila *et al.* (2009).

### 2.6. PCR-RFLP do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade II

Para amplificação do gene mitocondrial COII diretamente dos tecidos dos pacientes, foi utilizada a estratégia de *full nested* PCR (Freitas *et al.*, 2006; Valadares *et al.*, 2008). Na primeira etapa, foram utilizados os iniciadores externos DsMit-F e DsMit-R, enquanto que para

a segunda reação de amplificação foram utilizados os iniciadores internos Tcmit-10 e Tcmit-21 (Quadro 1). Após as duas reações de amplificação, foi realizada a digestão dos amplicons pela enzima de restrição Alu I (Promega), de acordo com as indicações do fabricante.

Os fragmentos gerados após a adição da enzima de restrição foram analisados em gel de poliacrilamida 6% e corado pela prata (Santos *et al.*, 1993). Os padrões utilizados para realizar a comparação dos RFLPs (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) foram cepas e clones característicos das DTUs I, II e VI. Foram eles, respectivamente: o clone Col.17G2 (TcI), que apresenta fragmentos com 30, 81, 264 pb, caracterizado como haplótipo mitocondrial A; a cepa JG (TcII) que apresenta fragmentos com 81 e 212 pb, caracterizado como haplótipo mitocondrial C; e o clone CL Brener (TcVI) que apresenta fragmentos com 81 e 294 pb, caracterizado como haplótipo B, sendo este compartilhado pelas demais DTUs (Freitas *et al.*, 2006). Assim, esta etapa permite a discriminação de TcI e TcII, mas não diferencia as DTUs III, IV, V e VI.

## 2.7. Amplificação da região intergênica dos genes miniéxon

A amplificação da região intergênica dos genes miniéxon foi realizada utilizando os iniciadores TCac e UTCC (Quadro 1). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, posteriormente corado por prata (Santos *et al.*, 1993). Utilizando desta técnica foi possível diferenciar as cepas pertencentes às DTUs III e IV das cepas pertencentes às DTUs I, II, V e VI, visto que os primeiros apresentaram um amplicon de ~200pb e os últimos de ~ 150-157 pb (Burgos *et al.*, 2007).

## 2.8. Amplificação da região 3' do gene rDNA 24 Sα

Para a diferenciação completa das DTUs III, IV, V e VI, foi ainda realizada à amplificação da região 3' do gene rDNA 24 Sα por meio do *hemi nested* PCR, adaptado de Souto *et al.* (1996). Foram utilizados, na primeira etapa de amplificação, os iniciadores externos D75 e D72 e na segunda etapa os iniciadores internos D71 e D72 (Quadro 1). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata (Santos *et al.*, 1993). Os controles positivos usados foram cepas ou clones que representam as DTUs I (clone Col1.7G2, fragmento de 110 pb), II (cepa JG, fragmento de 125 pb) e V (clone SO3 Cl5, fragmentos de 110 e 125 pb).

Quadro 1 - Sequências dos iniciadores utilizados

Técnica	Iniciador	Sequência	Referência
Controle de extração de DNA	<b>MID-768-F</b> <b>MID-768-R</b>	5'-CATTACCAGTAGAGTGGGGA-3' 5'-CTATGCCCTACTGGATCTAGG-3'	Weber <i>et al.</i> , 2002
PCR kDNA	<b>S35-F</b> <b>S36-R</b>	5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3' 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3'	Wincker <i>et al.</i> , 1994
PCR-RFLP COII	<b>DsMit- F</b> <b>DsMit- R</b> <b>Tcmit-10</b> <b>Tcmit-21</b>	5'-TGCATTACTCCTTTCTACAG-3' 5'-AACTCGCTACATTGTCCATA-3' 5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3' 5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3'	Freitas <i>et al.</i> , 2006
PCR rDNA 24S $\alpha$	<b>D71-F</b> <b>D72-R</b> <b>D75-F</b>	5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3' 5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT-3' 5'-CAGATCTTGTTGGCGTAG-3'	Souto <i>et al.</i> , 1993
PCR ITS-miniéxon	<b>TCac- F</b> <b>UTCC- R</b>	5'-CTCCCCAGTGTGGCCTGGG-3' 5'-CGTACCAATATAGTACAGAAACTG-3'	Burgos <i>et al.</i> , 2007

## 2. 10. Análises estatísticas

O índice kappa foi calculado para avaliar a concordância entre as duas PCRs que foram utilizadas para o diagnóstico molecular (Fleiss, 1981). As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fisher. O programa MedCalc foi utilizado para a construção das curvas ROC de acordo com DeLong *et al.* (1988).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 98 pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica que foram submetidos a transplante cardíaco no HC-UFMG no período de 2008 a 2018. Desses pacientes, 65 (66,3%) tiveram pelo menos um episódio de reativação chagásica após o transplante cardíaco durante o período do estudo, sendo o número médio de episódios de reativação de 1,25 (variando de 1 a 5 episódios). É relevante destacar que em todas as vezes que foi afirmado o diagnóstico de reativação, iniciou-se o tratamento etiológico imediatamente.

Em média, a primeira reativação clínica ocorreu 215,7 dias após o transplante, com mediana de 125 dias após a cirurgia, sendo que 75,4% dos pacientes apresentaram reativação em até 240 dias, cerca de 8 meses, pós-transplante. Estes dados não apenas corroboram

estudos anteriores que mostram que a maioria dos casos de reativação ocorre no primeiro ano pós-transplante (Revisado por Bacal *et al.*, 2010), como especificam a fase de maior risco para essa reativação.

Do ponto de vista das principais manifestações clínicas associadas à reativação, a forma cutânea (51%), seguida da cardíaca (42%), foi a mais prevalente. Além dessas, 6% dos pacientes apresentaram reativação neurológica, sendo que 15% apresentaram dois ou mais tipos de manifestação clínica, ou subclínica.

A alta incidência de pacientes chagásicos crônicos imunossuprimidos com desenvolvimento de lesões cutâneas ratifica achados antecedentes (Amato *et al.*, 1997; D'Avila *et al.*, 2005; Gallerano *et al.*, 2007; Kocher *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2016). O que nos leva a sugerir que, à semelhança da forma nervosa, talvez essa seja uma nova forma clínica da doença de Chagas, uma vez que, diversos casos de aparecimento de lesões cutâneas têm sido relatados como expressão da reativação do parasitismo pelo *T. cruzi* em pacientes chagásicos após transplante.

Contudo, apesar da alta taxa de reativação observada em nosso grupo de estudo, durante os 10 anos acompanhamento, apenas dois pacientes tiveram o seu óbito relacionado à reativação ou outras complicações associadas à doença de Chagas, tendo como causa do falecimento a reativação neurológica e a cardíaca. Mostrando que a mortalidade diretamente relacionada à reativação da infecção pós-transplante é baixa e que há adequada sobrevida em longo prazo.

### 3. 1. Diagnóstico Molecular

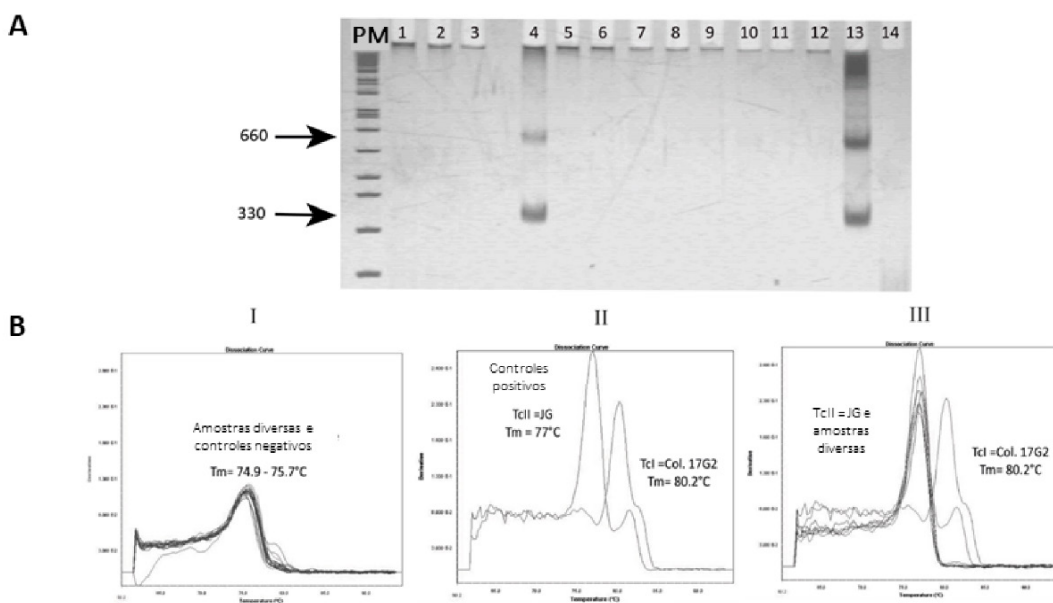
No presente estudo, avaliamos a possibilidade de utilização de metodologias baseadas em PCRs direcionadas para marcadores nucleares (rDNA 24S $\alpha$ ) e mitocondriais (kDNA), para o diagnóstico precoce da presença de *T. cruzi* nos tecidos de pacientes chagásicos transplantados. De 2008 a 2018, foram analisadas 991 BEMs, derivadas do acompanhamento pós-transplante cardíaco de 98 pacientes chagásicos, além de 14 biópsias de pele e três biópsias de sistema nervoso central (SNC), derivadas de casos de reativação cutânea ou neurológica.

Para a técnica de PCR convencional, tendo como alvo DNA mitocondrial, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram bandas de ~330 pb e 660 pb, que correspondem à amplificação de 1 ou 2 contíguos da região variável do minicírculo do kDNA (Figura 1A). Já para *hemi nested* PCR do gene do rRNA 24S $\alpha$ , os produtos foram identificados a partir das curvas de dissociação geradas pelo programa. As amostras positivas apresentaram altos picos de amplificação com a TM (do inglês *melting temperature*) entre 76- 81°C na curva



de dissociação, enquanto os resultados negativos e produtos inespecíficos mostraram picos irregulares exibindo TM fora desta faixa (Figura 1B).

Uma boa correlação entre os resultados gerados pelas duas técnicas de PCR foi observada, como demonstrado pelo índice de correlação de Kappa=0,557 e  $p < 0,001$ . Valores kappa variando de 0,75 a 0,40 são considerados como bom a razoável (Fleiss, 1981). Além disso, a utilização das duas metodologias foi essencial para o diagnóstico de todas as amostras positivas, visto que alguns pacientes que já apresentaram reativação clínica poderiam ter sido diagnosticados incorretamente utilizando apenas uma das técnicas. Sendo que 6,2% (4/65) e 10,8% (7/65) dos pacientes com reativação clínica foram diagnosticados apenas por rDNA 24S $\alpha$  ou PCR do kDNA, respectivamente.



**Figura 1** - Resultados representativos das técnicas de PCR

A) Amplificação das regiões variáveis 330/660-pb do minicírculo de kDNA do *T. cruzi* de biópsias de pacientes chagásicos transplantados: 1 a 12) BEMs dos pacientes; Paciente 4) amplificação positiva; 13) DNA da cepa JG de *T. cruzi* (controle positivo); 14) nenhum molde de DNA (controle negativo). PM) peso molecular padrão (1 kb Plus DNA Ladder; Invitrogen). (B) Picos obtidos na curva de dissociação para o gene rDNA24S $\alpha$  (I) Picos inespecíficos obtidos de amostras negativas em comparação aos controles negativos (sem DNA); (II) Picos típicos derivados do DNA de *T. cruzi* das populações JG (TcII) e Col1.7G2 (TcI) (controles positivos); (III) Picos obtidos a partir de BEMs positivas em comparação aos controles positivos.

No conjunto, foram analisadas, por essas duas estratégias, mais de mil amostras de

tecidos de pacientes, entre biópsias endomiocárdicas, de pele e de SNC. Essa é uma coorte impressionante, e dentro do nosso conhecimento, única. A presença de DNA de *T. cruzi* foi detectada em 21% dessas amostras (205 BEMs, oito biópsias de pele e três biópsias de SNC), obtidas de 70 pacientes que apresentaram algum resultado positivo para pelo menos um dos testes moleculares realizados para diagnóstico.

Do total de pacientes com pelo menos um resultado positivo de PCR, 51/70 (73%) já apresentaram ao menos um episódio de reativação clínica da doença de Chagas ao decorrer dos anos de acompanhamento. Esses resultados são bastante significativos e demonstram boa associação entre os resultados gerados pelo diagnóstico molecular e a ocorrência de reativação clínica da doença, em algum momento após o transplante.

Em um estudo inicial, abrangendo 29 pacientes e tomando como padrão-ouro os sinais clínicos de reativação, a comparação da técnica PCR (79%) com as técnicas de análise histopatológica (32%), esfregaço sanguíneo (37%) e hemocultura (26%) revelou que a metodologia molecular proposta por nós apresenta sensibilidade bem superior às demais. Resultados semelhantes foram obtidos pela comparação das áreas sob as curvas ROC, que indicou que o método de PCR descrito no presente estudo possui maior acurácia em relação aos demais testes (publicado em Costa *et al.*, 2017).

Ademais, há uma razoável concordância entre aqueles pacientes que apresentam PCR positiva já nas primeiras seis biópsias, com aqueles que reativam a infecção mais precocemente, sugerindo que a realização do diagnóstico molecular apenas nas primeiras biópsias já auxiliaria em muito os médicos nas decisões do tratamento (Costa *et al.*, 2017).

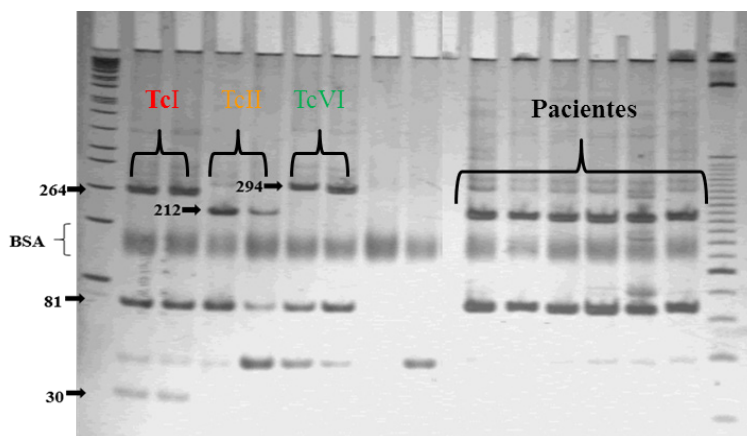
Além disso, considerando nossos dados obtidos até o momento, os primeiros resultados positivos para o diagnóstico molecular puderam ser obtidos mais precocemente, variando entre uma semana e 34 meses pós-transplante, com mediana de 1,7 meses (em média 5,2 meses). Isso permite, a antecipação da reativação clínica da doença de Chagas em até 4 anos, com uma mediana de cerca de 2 meses (em média 5,3 meses), revelando seu potencial para auxiliar nas decisões do médico sobre a melhor condução terapêutica em cada caso.

Tomados em conjunto nossos achados nos permitiram propor um algoritmo para vigilância da reativação chagásica, baseada nos testes moleculares, que poderiam contribuir para uma mudança significativa no protocolo de acompanhamento e tratamento dos pacientes chagásicos transplantados, a fim de melhorar a qualidade de vida dos mesmos (Costa *et al.*, 2017).

### **3. 2. Caracterização das subpopulações de *T. cruzi* diretamente de amostras de tecidos de pacientes cardiopatas chagásicos transplantados.**

As 216 amostras biológicas positivas nas PCRs de diagnóstico (205 BEMs, oito biópsias de pele e três biópsias de SNC) foram submetidas ao protocolo de genotipagem das DTUs de *T. cruzi*, baseado no triplo ensaio, como proposto por D'Avila *et al.*, 2009.

Logo no primeiro ensaio realizado, os perfis de RFLP obtidos dos fragmentos amplificados para o gene COII nos permitiram verificar que a maioria das amostras apresentavam fragmentos característicos do haplótipo mitocondrial C (81 e 212 pb), que é correspondente a DTU II (Figura 2). Uma das amostras apresentou haplótipo B (81 e 294 pb) para este marcador, característico das DTUs III, IV, V e VI.



**Figura 2** - Padrões típicos de RFLP gerados a partir de produtos amplificados do gene mitocondrial COII diretamente dos tecidos dos pacientes depois da digestão com *AluI*.

Legenda: 1-6) Controles de amplificação: 1-2) clone Col.17G2 (30, 81, 264 pb - haplótipo mitocondrial A); 3-4) cepa JG (81 e 212 pb - haplótipo mitocondrial C); 5-6) clone CL Brener (81 e 294pb - haplótipo mitocondrial B); 7) Controle negativo do processo de digestão com a enzima *AluI*; 8) Controle negativo da reação de PCR; 9- 14) BEMs dos pacientes; PM<sub>1</sub>) Padrão de peso molecular (1kb Plus DNA Ladder - Invitrogen®); PM<sub>2</sub>) padrão de peso molecular – 25 pb DNA Ladder (Invitrogen®).

Mesmo após a reação de PCR-RFLP do gene COII ter permitido a identificação de 156 amostras como TcII (72,22%), estas, assim como as demais amostras foram submetidas às subseqüentes reações do triplo ensaio para a genotipagem. Todas as amplificações para miniéxon resultaram em fragmentos de 150 pb, característico das DTUs I, II, V e VI. Já as reações para o rDNA 24 Sα apresentaram, em maioria, fragmentos de 125 pb, característico das DTUs II e VI confirmando os padrões esperados para a DTU II em grande parte das amostras (Tabela 1). Curiosamente, em uma das BEMs que havia apresentado haplótipo mitocondrial tipo B pôde

ser confirmada a presença de DTU VI (Tabela 1).

**Tabela 1** - Identificação das DTUs de *T. cruzi* em biópsias de pacientes chagásicos transplantados

DTUs	Número de amostras		
	BEMs	Biópsias de pele	Biópsias SNC
II	145	8	3
VI	1	-	-
II ou VI*	25	-	-
I, II, V ou VI*	2	-	-
Não identificado**	32	-	-
<b>Total</b>	<b>205</b>	<b>8</b>	<b>3</b>

Legenda: \*As DTUs dessas amostras não puderam ser completamente identificadas por não ter sido amplificado um dos três marcadores utilizados. \*\* As DTUs não puderam ser identificadas por não ter sido amplificado nenhum dos três marcadores utilizados no triplo ensaio.

Como já esperado, dadas as características da região de procedência da maior parte dos pacientes – Minas Gerais –, em 85% das amostras, as populações do *T. cruzi* presentes nos tecidos foram genotipadas como pertencentes à DTU II (Tabela 1). Esta é a DTU prevalente na região endêmica estudada (Macedo & Segatto, 2010). Todavia, entre as BEMs analisadas foi detectada, em um caso, a presença de populações do parasito pertencentes à TcVI. De fato, tanto TcV quanto TcVI vêm sendo encontradas em casos de infecções humanas na região do Gran Chaco e países vizinhos, como Bolívia, Chile, Argentina e Brasil (Diosque *et al.*, 2003; Cardinal *et al.*, 2008).

Em virtude de todos os aspectos mencionados, conclui-se que o presente trabalho nos permitiu observar que técnicas moleculares podem auxiliar na elaboração de estratégias terapêuticas antecipadas e trazer a perspectiva de mudança significativa no protocolo de acompanhamento e tratamento dos pacientes chagásicos transplantados. Assim como revelou interessantes achados sobre a epidemiologia molecular do *T. cruzi* nesta região geográfica, por meio da caracterização do parasito diretamente em tecidos de pacientes.

## REFERÊNCIAS

AMATO, J. G.; AMATO NETO, V.; AMATO, V. S. *et al.* Lesões cutâneas como únicas manifestações de reativação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em receptora de rim por transplante. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 30, p. 61- 63, 1997.

- ANDRADE, J. A.; MARIN-NETO, J. A.; PAOLA, A. A. V.; *et al.* **I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 97, p. 1- 48, 2011.
- BACAL, F.; SOUZA-NETO, J. D.; FIORELLI, A. I. *et al.* **II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 94, p. E16- 73, 2009.
- BACAL, F.; SILVA, C. P.; PIRES, P. V. *et al.* **Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades.** Clinical transplantation, v. 24, n. 2, p. 29- 34, 2010.
- BACAL, F.; MARCONDES-BRAGA, F. G.; ROHDE, L. E. P.; *et al.* **3ª Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 111, n. 2, p. 230- 289, 2018.
- BENVENUTI, L. A.; ROGGÉRIO, A.; SAMBIASE, N. V.; FIORELLI, A.; HIGUCHI, M. L.; **Polymerase chain reaction in endomyocardial biopsies for monitoring reactivation of Chagas' disease in heart transplantation A case report and review of the literature.** Cardiovascular Pathology, v. 14, p. 265- 268, 2005.
- BENVENUTI, L. A., ROGGERIO, A.; COELHO, G.; FIORELLI, A. I. **Usefulness of qualitative polymerase chain reaction for *Trypanosoma cruzi* DNA in endomyocardial biopsy specimens of chagasic heart transplant patients.** Journal of Heart and Lung Transplantation, v. 30, n.7, p. 799- 804, 2011.
- BESTETTI, R. B.; SOUZA, T. R.; LIMA, M. F. *et al.* **Effects of a mycophenolate mofetil- based immunosuppressive regimen in Chagas' heart transplant recipients.** Transplantation v. 84, p. 441- 442, 2007.
- BOCCHI, E. A.; BELLOTTI, G.; MOCELIN, A. O. *et al.* **Heart transplantation for chronic Chagas' heart disease. The Annals of Thoracic Surgery,** v. 61, n. 6, p. 1727- 1733, 1996.
- BOCCHI, E. A.; FIORELLI, A. **The brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report.** The Journal of Heart and Lung Transplantation, v. 20, p. 637- 645, 2001a.
- BOCCHI, E. A.; FIORELLI, A. **The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*.** First guidelines group for heart transplantation of the brazilian society of cardiology. The Annals of Thoracic Surgery, v. 71, p. 1833- 38, 2001b.
- BRASIL, P. E.; CASTRO L.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; SANGENIS, L. H.; BRAGA, J. U. **ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis.** BMC Infectious Diseases, v.10: 337, 2010.
- BURGOS, J. M.; ALTCHER, J.; BISIO, M. *et al.* **Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease.** International Journal for Parasitology, v. 37, n. 12, p. 1319- 1327, 2007
- CAMPOS, F. P.; PANSARD, H. M.; ARANTES, L. C. *et al.* **Paniculite chagásica pós-transplante renal: relato de caso.** Brazilian Journal of Nephrology, v. 38, n. 1, 2016.
- CARDINAL, M. V.; LAURICELLA, M. A.; CEBALLOS, L. A. *et al.* **Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina.** International Journal for Parasitology, v. 38, n. 13, p. 1533- 1543, 2008.
- CASTRO, A. M.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; RASSI, G. G.; CHIARI, E. *et al.* **Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*.** Parasitology Research, v. 88, n. 10, p. 894- 900, 2002.
- COSTA, P. A.; SEGATTO, M.; DURSO, D.F. MOREIRA, M. C. V.; MACEDO, A. M. *et al.*, **Early PCR detection of Chagas disease reactivation in heart-transplanted patients.** The Journal Heart and Lung transplantation, v. 36, n. 7, p. 797- 805, 2017.
- D'AVILA, S.C.G.P.; D'AVILA, A. M. M. P.; PAGLIARI, C.; GONÇALVES, V. M.; DUARTE, M. I. S. **Eritema nodoso como forma de reativação da doença de Chagas em transplantado cardíaco.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38, p. 61- 63, 2005.
- D'AVILA, D. A.; MACEDO, A. M.; VALADARES, H. M. *et al.* **Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients.** Journal of Clinical Microbiology, v. 47, n. 6, p. 1718- 1725, 2009.

- DELONG, E. R.; DELONG, D. M.; CLARKE-PEARSON, D. L. **Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach**, *Biometrics*, v. 44, n. 3, p. 837- 845, 1988.
- DIEZ, M.; FAVALORO, L.; BERLOTTI, A. *et al.* **Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation**. *American Journal of Transplantation*, v. 7, n. 6, p. 1633- 1640, 2007.
- DINARDI, L. F. L.; PALAZZO, J. F.; PEREIRA, T. V. *et al.* **Heart transplantation in Chagas' disease**. *Revista de Medicina (São Paulo)*, v. 91, n. 4, p. 229- 240, 2012.
- DIOSQUE, P.; BARNABE, C.; PADILLA, A. M. *et al.* **Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina**. *International Journal for Parasitology*, v. 33, n. 10, p. 997- 1003, 2003.
- FLEISS, J. L. **Statistical methods for rates and proportions**, 1981.
- FREITAS, J. M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, S. D. PENA; MACEDO, A. M. **Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues**. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 4, p. 411- 417, 2005.
- FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R. *ET AL.* **Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi***. *PLOS Pathogens*, v. 2, n. 3, p. e24, 2006.
- GALLERANO, V.; CONSIGLI, J.; PEREYRA, S. *et al.* **Chagas' disease reactivation with skin symptoms in a patient with kidney transplant**. *International Journal of Dermatology*, v. 46, p. 607- 610, 2007.
- GOMES, Y.M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. **Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, s. 1, p. 115-121, 2009.
- KOCHER, C.; SEGERER, S.; SCHLEICH, A. *et al.* **Skin lesions, malaise, and heart failure in a renal transplant recipient**. *Transplant Infectious Disease*, v. 14, p. 391- 397, 2012.
- LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. **Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi***, In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*, Editora Guanabara Koogan, 2ª edição, p. 344- 378, 2000.
- MACEDO, A. M. & PENA, S. D. **Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease**. *Parasitology Today*, v. 14, n. 3, p. 119- 124, 1998.
- MACEDO, A. M. & SEGATTO, M. **Implications of *Trypanosoma cruzi* intraspecific diversity in the pathogenesis of Chagas disease**. In: Tibayrenc, M & Telleria, J. *American Trypanosomiasis Chagas disease one hundred years of research*. Elsevier, v. 1, p. 498- 522, 2010.
- MACHADO, F. S.; JELICKS, L. A.; KIRCHHOFF, L. V. *et al.* **Cardiology in Review**, v. 20, n. 2, p. 53- 65, 2012.
- MALDONADO, C.; ALBANO, S.; VETTORAZZI, L.; *et al.* **Using polymerase chain reaction in early diagnosis of re-activated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation**. *The Journal Heart and Lung transplantation*, v. 23, n. 12, p. 1345- 1348, 2004.
- MARCHIORI, P. E.; ALEXANDRE, P. L.; BRITTO, N. *et al.* **Late reactivation of Chagas' disease presenting in a recipient as an expansive mass lesion in the brain after heart transplantation of chagasic myocardopathy**. *The Journal Heart and Lung transplantation*, v. 26, n. 11, p. 1091-1096, 2007.
- MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N. JR.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. **Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta- analysis**. *Acta Tropica*, v. 130, p. 167- 174, 2014.
- PORTELA-LINDOSO, A. A. B. & SHIKANAI-YASUDA, M. A. **Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase**. *Revista de Saúde Pública*, v.37, n.1, p. 107- 115, 2003.
- SANTOS, F. R.; EPPLIN, J. T.; PENA, S. D. **Testing deficiency paternity cases with a Ylinked tetranucleotide repeat polymorphism**. *EXS*, v. 67, p. 261- 265, 1993.
- SCHIJMAM, A. G.; VIGLIANO, C.; BURGOS, J. *et al.* **Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection**



by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, v. 19, n. 11, 1114-1117, 2000.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T. *ET AL.* International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.5, n. 1, p. e931, 2011.

SOUTO, R. P. & ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 62, n. 1, p. 45- 52, 1993.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 83, n.2, p.141-152, 1996.

SOUZA, M. M.; FRANCO, M.; ALMEIDA, D. R. *et al.* Comparative histopathology of endomyocardial biopsies in chagasic and non-chagasic heart transplant recipients. *The Journal Heart and Lung transplantation*, v. 20, n. 5, p. 534- 543, 2001.

TIBAYRENC, M.; BARNABÉ, C.; TELLERIA, J. Reticulate Evolution in: Medical and Epidemiological Implications. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. American trypanosomiasis: Chagas disease One hundred years of research. Burlington: Elsevier, p. 475- 488, 2010.

VALADARES, H. M.; PIMENTA, J. R.; DE FREITAS, J. M. *et al.* Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 7, p. 839- 850, 2008.

VALENTE, S. A; VALENTE, V. C.; PINTO, A. Y. N. *et al.* O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, p. 291- 297, 2009.

WEBER, J. L.; DAVID, D.; HEIL, J. *et al.* Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, v. 71, n. 4, p. 854- 862, 2002.

WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J. B; CARDOSO, M. A. W.; OELEMANN, *et al.* Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *T. cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 51, n. 6, p. 771- 777, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis). *Weekly Epidemiological Record*, v. 85, n. 34, p. 334- 336, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *The Weekly Epidemiological Record*, v. 90, p. e33- 43, 2015.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R., *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 1051- 1054, 2009.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: one parasite, two parasites or several parasites of Chagas disease? *Revista da Biologia*, v. 6, p. 44- 48, 2011.

## MOLECULAR ASPECTS ASSOCIATED WITH CHAGASIC CARDIOMYOPATHY AND INFECTION REACTIVATION IN HEART TRANSPLANT PATIENTS

### Abstract

Heart transplantation is a therapeutic option considered in the advanced stage of Chagas cardiomyopathy. However, after transplantation, the differential diagnosis of rejection versus reactivation of Chagas disease has been considered difficult, making correct treatment difficult. The reason why some chagasic patients present post-transplant disease reactivation is unknown. It is estimated that there are factors related to the parasite's genetic variability.



Therefore, we investigated the possibility of using PCRs directed to nuclear (rDNA 24S $\alpha$ ) and mitochondrial (kDNA) markers for detection of *Trypanosoma cruzi* in hearts of transplanted chagasic patients; as well as the occurrence of *T. cruzi* subpopulations more associated with infection reactivation, using a triple assay for determination of DTUs (COII, miniexon intergenic spacer, 24S $\alpha$  rDNA). A total of 991 endomyocardial biopsies (EMB) derived from 98 patients, 14 skin biopsies, and three from the central nervous system (CNS) were analyzed. *T. cruzi* DNA was detected in 205 EMB (70 patients), eight skin biopsies, and three CNS biopsies. Compared to other diagnostic techniques used, PCR revealed superior sensitivity, with considerable specificity, and could anticipate the clinical reactivation of Chagas disease between 1.5 and 36 months (mean 9.1 months), contributing to the early diagnosis. Most patients had reactivation by TcII, corroborating the idea that this is the main DTU associated with the cardiac form of Chagas disease, at least in this geographic region.

**Keywords:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, heart transplantation, chagasic reactivation, endomyocardial biopsy, molecular diagnosis, polymerase chain reaction, PCR.

# CAPÍTULO 3

## A REGULAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO DE DANOS DE DNA POR AGENTES TERAPÊUTICOS EM GLIOBLASTOMA

**Paulo Matheus Guerra Ribeiro de Sousa  
Rodrigues**

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Rio de Janeiro, RJ.

[lattes.cnpq.br/0877605725741425](http://lattes.cnpq.br/0877605725741425)

**RESUMO** - Agentes genotóxicos são largamente utilizados como agentes terapêuticos contra câncer por induzirem resposta a danos de DNA (DDR). A DDR compreende desde a parada de ciclo até o reparo das lesões ou a morte celular em resposta a elas. Dentre as vias moleculares de DDR, aquela mediada pela sinalização de MRE11/RAD50/NBS1 e ATM demonstra ter um papel-chave na resistência de glioblastoma (GBM) à radiação ionizante. Já foi demonstrado que em células-tronco tumorais de GBM a radiação ionizante aumenta os níveis proteicos de NBS1 e ativa exacerbadamente a via de ATM, em comparação com células não-tronco isoladas dos mesmos espécimes. Contudo, em estudos prévios determinadas linhagens estabelecidas de GBM demonstraram ser mais resistentes a diferentes agentes genotóxicos do que células-tronco desse tipo tumoral. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se há aumento de NBS1 em linhagens de GBM e se isso está correlacionado com a sensibilidade a

agentes terapêuticos. No presente trabalho, a linhagem M059J apresentou maiores reduções de viabilidade após exposição à radiação ionizante, temozolomida (TMZ) e etoposídeo, em comparação com as linhagens U87MG e U138MG. Foi verificado que nas três linhagens a quantidade de NBS1 não é alterada por nenhum destes agentes genotóxicos. No entanto, os níveis proteicos do fator de transcrição c-Myc foram reduzidos nas três linhagens após irradiação. Em conjunto, esses resultados sugerem que há outras vias de DDR envolvidas na resistência terapêutica de GBM. Além disso, os dados aqui apresentados indicam que não somente as subpopulações de células-tronco podem contribuir para a recidiva tumoral.

**PALAVRAS-CHAVE:** glioblastoma, resposta a danos de DNA, radiação ionizante, temozolomida.

### 1. INTRODUÇÃO

Quando nos referimos a câncer, estamos fazendo menção a um conjunto de mais de cem doenças, as quais apresentam como aspecto comum a proliferação desordenada de células. Essa característica fundamental do câncer decorre de um conjunto de alterações funcionais que

possibilitam o crescimento tumoral e promovem a capacidade de disseminação (HANAHAN & WEINBERG, 2011, 2000).

Entre estas alterações funcionais, destaca-se a instabilidade genômica, que é intimamente relacionada à desregulação da resposta a danos de DNA (DDR, do inglês *DNA damage response*), um conjunto de vias moleculares que promovem a manutenção da integridade do genoma pela detecção e correção das lesões (JACKSON & BARTEK, 2009). Essas vias moleculares englobam uma gama de cinases, fosfatases, glicosilases, helicases, topoisomerases, demetilases, ligases, nucleases e polimerases (CICCIA & ELLEDGE, 2010). Em células proliferantes, o estresse genotóxico é capaz de retardar a progressão no ciclo celular, sendo um fenômeno mediado por diversas vias de detecção e sinalização de danos no DNA, as quais são conhecidas como *checkpoints* (KASTAN, 1992). Basicamente, o retardo na progressão do ciclo celular consiste no bloqueio das transições entre as fases G1 e S, entre as fases G2 e M, como também dentro da progressão da fase S. Dentre os vários tipos de dano de DNA, as quebras de fita-única (SSB, do inglês *single-strand break*) e quebras de fita-dupla (DSB, do inglês *double-strand break*) são as principais promotoras de parada de ciclo. A geração de SSB e DSB pode ocorrer devido a diversos fatores, desde aqueles fisiológicos, como a estagnação da forquilha de replicação do DNA, até a exposição celular a agentes externos como a radiação ionizante (IR, do inglês *ionizing radiation*) (FENG, 2011; NITISS, 2009).

O reconhecimento das quebras de DNA é realizado por diversas proteínas sensores, que se ligam aos sítios de dano após sua ocorrência. Um conjunto de sensores bem caracterizado é o complexo MRN, formado pelas proteínas MRE11-RAD50-NBS1, que se liga ao sítio de quebra de DNA e leva à monomerização da proteína ATM, considerada uma cinase transdutora do sinal de dano de DNA (PAULL, 2015). É bem conhecido que a interação entre MRN e ATM pode ocorrer principalmente pelo domínio C-terminal de NBS1 (também denominada nibrina) (DUPRÉ, 2006). Após a ligação de ATM com o complexo MRN, ocorre a autofosforilação da cinase e sua já mencionada monomerização (BERKOVICH, 2007). Uma vez monomerizada e portando as devidas modificações pós-traducionais, ATM é considerada ativada, e prossegue com as fosforilações de seus alvos. Entre eles, tem-se: histona H2A.X (resíduo S139); RAD50 (S635); NBS1 (S343 e S278) e *checkpoint kinase 2* (CHK2), uma cinase efetora do *checkpoint*, a qual é fosforilada por ATM no resíduo T68, em células humanas (HIRAO, 2002; MATSUOKA, 2000). Uma vez fosforilada por ATM neste sítio, CHK2 se torna ativada e se autofosforila, se dimeriza e fosforila proteínas reguladoras da progressão entre fases do ciclo celular, como a fosfatase CDC25, que é exportada do núcleo após esta modificação pós-traducional (BARTEK & LUKAS, 2003). CHK2 também fosforila p53 no resíduo S20, sendo que este fator de transcrição também é alvo de ATM no sítio S15 (CHEHAB, 2000; SHIEH, 1997). As fosforilações de p53 por CHK2 e ATM culminam na sua dissociação da ubiquitina-E3-ligase MDM2, o que a estabiliza

(CHENG, CHEN, 2010). p53 pode induzir a parada do ciclo celular induzindo a transcrição de inibidores de CDK, como p21; e/ou a apoptose pela transcrição de genes pró-apoptóticos como BAX e PUMA, entre outros (RILEY, 2008).

A relevância das cascatas de sinalização de DDR em câncer é o fato de que as modalidades não-cirúrgicas de tratamento se baseiam, majoritariamente, no uso de agentes indutores de danos de DNA. Entre estes, podem ser citados a radiação ionizante, os agentes alquilantes e os inibidores de topoisomerases (HELLEDEY, 2008). Portanto, é possível afirmar que, em última instância, o sucesso ou fracasso dos tratamentos mediados por agentes genotóxicos está relacionado diretamente à DDR que eles desencadeiam nas células tumorais.

Dentre os tumores mais agressivos e de elevada taxa de reincidência, está o tumor cerebral glioblastoma (GBM), classificado pela Organização Mundial de Saúde como um glioma de alto grau (grau IV). A taxa de sobrevida em 5 anos é menor do que 5%, e em geral os pacientes sobrevivem 2,5 anos após o diagnóstico. Atualmente, as diretrizes de tratamento de GBM recém-diagnosticado envolvem um tratamento multimodal, em que o fator idade é considerado: ressecção e radioterapia com quimioterapia adjuvante, para a faixa etária abaixo de 65 anos; e ressecção e radioterapia ou quimioterapia, para a faixa de etária de 65 a 70 anos (WELLER, 2014; STUPP, 2010). A terapia pós-operatório se faz necessária dada a natureza infiltrante destes tumores, o que torna uma ressecção completa praticamente impossível. A radiação ionizante é aplicada focalmente na região do tumor, de maneira fracionada (em média, dose de 2 Gy por sessão), atingindo uma dose acumulada de 60 Gy ao fim do tratamento. Segundo os guias de tratamento, o principal adjuvante à radioterapia é o agente alquilante temozolomida (TMZ), da classe imidotetrazinona (COHEN, 2005). A terapia bimodal radiação ionizante/TMZ demonstrou prolongar a sobrevida média dos pacientes para 14,6 meses, em contraste com a sobrevida média de 12,1 meses dos pacientes tratados apenas com radioterapia (STUPP, 2005).

No entanto, estes tratamentos são ainda paliativos, uma vez GBM apresenta radio- e quimiorresistência. Na última década, surgiram evidências de que estas formas de resistência seriam mediadas por subpopulações celulares intratumorais que expressam determinados marcadores de células-tronco embrionárias (CD133, SSEA1), e que apresentam propriedades tumorigênicas diferenciadas (SON, 2009). Estas subpopulações são frequentemente denominadas “células-tronco de glioma” (GSC, do inglês *glioma stem-cell*). É importante ressaltar que o conceito da existência de células-tronco tumorais é aplicado também a outros tipos de câncer. Em GBM, diversos estudos identificaram as GSCs através do marcador CD133. Foi demonstrado *in vitro* e em xenoenxertos que, após irradiação, subpopulações celulares CD133+ apresentavam maiores níveis de ativação de ATM, RAD17, CHK1 e CHK2, reparo mais

rápido das quebras de DNA e menor taxa de apoptose do que subpopulações negativas para CD133 (CD133-) (BAO, 2006). Foi sugerido que a ativação exacerbada da sinalização de dano de DNA causaria a maior sobrevivência celular à radiação ionizante e que tal propriedade seria exclusiva de GSC, por influir na velocidade de reparo dos danos de DNA. No entanto, outro estudo, também utilizando culturas primárias de GBM, não encontrou diferença na cinética de reparo de DNA ao comparar células CD133+ e CD133-, embora também tenha mostrado maior ativação de CHK2 nas células CD133+ tanto de maneira basal quanto após irradiação (ROPOLO, 2009). Esses achados sugeriram que a radiorresistência observada na subpopulação CD133+ não decorreria de uma cinética mais veloz de reparo, e sim de uma maior ativação basal dessa via de sinalização, o que tornaria mais longa a parada de ciclo celular, permitindo que o dano seja reparado antes do disparo de apoptose. Também já foi mostrado um aumento de expressão de NBS1 em células CD133+ de culturas primárias de GBM 48 horas após irradiação, indicando relação direta com a ativação do *checkpoint* G1-S (CHENG, 2011). Esses dados sugerem um possível efeito radioprotetor do *checkpoint* de dano de DNA em GBM e um possível papel de NBS1 neste mecanismo. Todavia, o silenciamento gênico de NBS1 em linhagem linfoblastóide humana demonstrou elevar a sobrevivência celular pós-irradiação (ZHANG, 2005), o que sugere algum nível de heterogeneidade no papel desse sensor de dano.

O estudo de Cheng et al. (2011) também forneceu evidências de que o aumento de NBS1 em células radioresistentes de GBM seria mediado pelo fator de transcrição c-Myc, uma vez que seu conteúdo proteico aumentou após irradiação (CHENG, 2011). c-Myc é um fator de transcrição que faz parte de uma família codificada pelos proto-oncogenes MYC (KRESS, 2015). Estudos prévios já demonstraram que tanto o silenciamento gênico quanto a superexpressão de c-Myc podem levar a apoptose induzida por irradiação e outros insultos genotóxicos (WANG, 2013). Não está totalmente elucidado o mecanismo molecular pelo qual c-Myc se relaciona com o *checkpoint* de dano de DNA, mas sabe-se que c-Myc se liga no promotor de NBS1 (CHIANG, 2003). Em fibroblastos de rato, o aumento no conteúdo proteico de NBS1 após irradiação depende de c-Myc, e em células HeLa o silenciamento de c-Myc comprometeu a ativação de ATM em resposta à irradiação (CUI, 2015; GUERRA, 2010).

A resistência a agentes quimioterápicos também demonstra relação com a ativação da via de *checkpoint* de dano de DNA. Já foi verificado *in vitro* que a perda de função de ATM aumenta a sensibilidade celular de GBM à TMZ (EICH, 2013). Assim como a perda de função de ATM aumenta a sensibilidade celular a TMZ, a ausência funcional de NBS1 em fibroblastos eleva a taxa de morte em resposta a droga (EICH, 2010). Já foi demonstrado que o tratamento de células da linhagem de GBM U87MG com TMZ aumenta a associação de NBS1 com a cromatina (MIRZOEVA, 2006). Diferentemente do resultado obtido por irradiação (CHENG, 2011), Mirzoeva e colaboradores não observaram elevação do conteúdo total de NBS1 após

exposição das células a TMZ.

## 2. OBJETIVO

Avaliar se diferentes agentes terapêuticos regulam os níveis de NBS1 e c-Myc em linhagens de glioblastoma, para se verificar se existe uma correlação entre estas modulações e a resistência celular aos tratamentos.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Linhagens celulares e agentes terapêuticos

Células das linhagens de glioblastoma U138MG, U87MG e M059J foram cultivadas em meio DMEM-F12, pH 7,2, complementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram expostas a diferentes doses de radiação ionizante (1, 10 e 30 Gy), através do acelerador linear de elétrons CLINAC 2100C (Varian) com energia de 6 MeV a uma taxa de 400 cGy/min. Os quimioterápicos utilizados foram: etoposídeo e TMZ. Para o tratamento das células, os quimioterápicos foram diluídos serialmente em meio de cultura para se obter concentrações de 1, 10 e 50 µM, para etoposídeo, e 100 e 500 µM para TMZ.

### 3.2 Análise de viabilidade celular por MTT

As células foram semeadas com densidade de 40.000 células/cm<sup>2</sup> e cultivadas por 16 horas antes de serem expostas aos agentes terapêuticos. Após os tratamentos, MTT (5 mg/ml) foi adicionado e mantido por 4 horas. Em seguida, o meio foi removido e DMSO foi adicionado para solubilização. A absorvância foi medida a 570 nm. Todas as análises foram feitas em triplicata.

### 3.3 Western-blotting

Células foram semeadas com densidade de 30.00 células/cm<sup>2</sup> e cultivadas por 16 h antes da exposição aos agentes terapêuticos. Após 48 h de tratamento, as células foram lisadas e os extratos proteicos dosados pelo método de Bradford. Os extratos foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os conteúdos proteicos foram transferidos para membranas de nitrocelulose, as quais foram bloqueadas e expostas aos anticorpos anti-NBS1 (1:1.000) e anti-c-Myc (1:1.000). Para análise do carregamento proteico, foi utilizado anti- $\alpha$ -tubulina (1:1.000) ou anti-GAPDH (1:1.000). A análise densitométrica das bandas reveladas



no western-blotting foi realizada através do software ImageLab™ (Bio-Rad). Todas as análises foram feitas em triplicata.

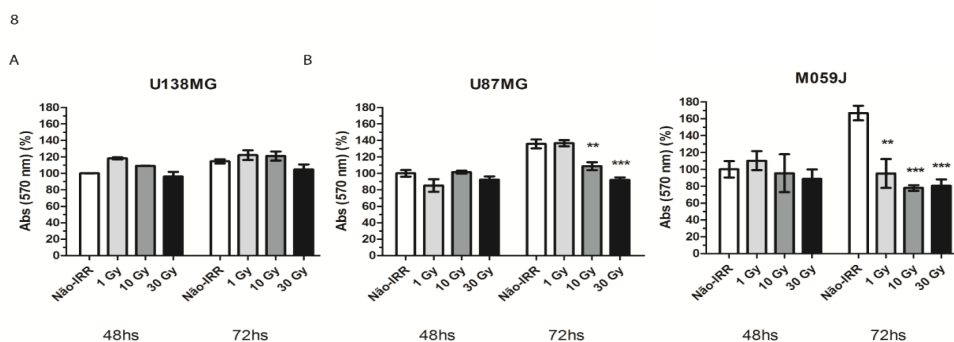
### 3.4 Análise estatística

O ensaio de MTT foi analisado por two-way ANOVA e western-blotting através de one-way ANOVA. Ambos foram seguidos de comparação múltipla pelo método de Bonferroni, através do software Prism™ (versão 6.0, GraphPad). As diferenças foram consideradas significativas quando o p-valor era menor que 0,5 ( $< 0,5$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito da radiação ionizante na viabilidade de U138MG, U87MG e M059J.

Relatos prévios demonstram, através de ensaios de sobrevivência clonogênica e de exclusão de azul de trypan, que as linhagens U138MG e U87MG possuem padrão de sensibilidade à radiação ionizante semelhante (MARAMPON, 2014; DAL-PIZZOL, 2003). Todavia, a linhagem M059J foi demonstrada ser extremamente sensível a este agente genotóxico (LEES-MILLER, 1995). Para confirmar estes resultados, células das linhagens U87MG, U138MG e M059J em fase exponencial de crescimento foram expostas a 1, 10 e 30 Gy de radiação ionizante e a viabilidade celular foi analisada 48 e 72 horas após a irradiação. A linhagem U138MG não apresentou redução de viabilidade celular (Figura 1A). A linhagem U87MG apresentou redução da viabilidade pelas doses de 10 Gy (20%) e 30 Gy (33%) 72 h após a irradiação (Figura 1B). A linhagem M059J apresentou redução de viabilidade de aproximadamente 50% 72 h após as doses de 1, 10 e 30 Gy (Figura 1C).

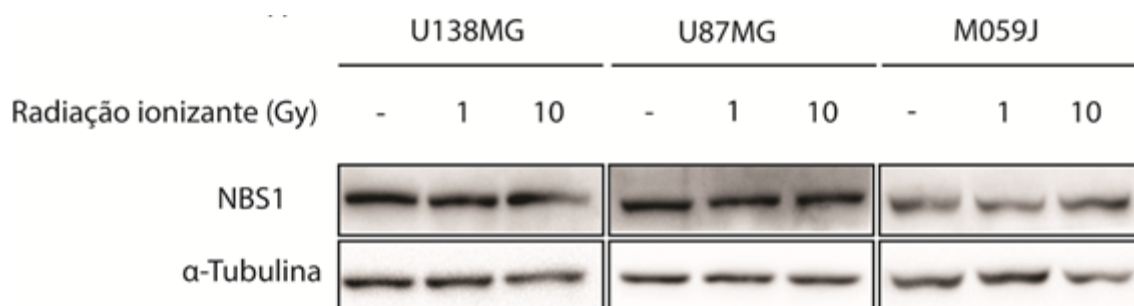


**Figura 1** - Viabilidade celular das linhagens U138MG, U87MG e M059J em resposta à radiação ionizante

## 4.2 Efeito da radiação ionizante nos níveis de NBS1 e c-Myc nas linhagens U87MG, U138MG e M059J

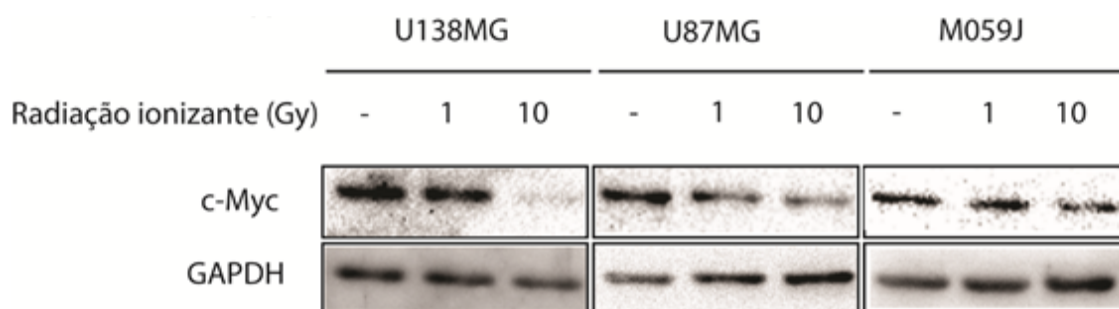
Em GSCs de GBM, a radiação ionizante demonstrou aumentar os níveis proteicos de NBS1 e c-Myc (CHENG, 2011). No entanto, a modulação dessas proteínas em linhagens de GBM nunca tinha sido analisada. Para determinar se estes eventos também ocorrem em linhagens de GBM, o conteúdo proteico de NBS1 e do fator de transcrição c-Myc foram analisados 48hs após a exposição das linhagens a 1 e 10 Gy de radiação ionizante. Nenhuma das linhagens apresentou alteração do conteúdo de NBS1 após exposição a 1 e 10 Gy (Figura 2).

**Figura 2 – Níveis de NBS1 após irradiação**



Contudo, diferenças foram observadas no conteúdo de c-Myc 48 h após irradiação. Os níveis proteicos de c-Myc foram reduzidos em U138MG e M059J. Células U138MG apresentaram 44% de decréscimo de c-Myc por 1 Gy e 90% por 10 Gy. U87MG apresentou redução de 18% e 58% por 1 Gy e 10 Gy, respectivamente. M059J apresentou 50% e 80% menos conteúdo de c-Myc por irradiação com 1 Gy e 10 Gy (Figura 3).

**Figura 3 – Níveis de c-Myc após irradiação**

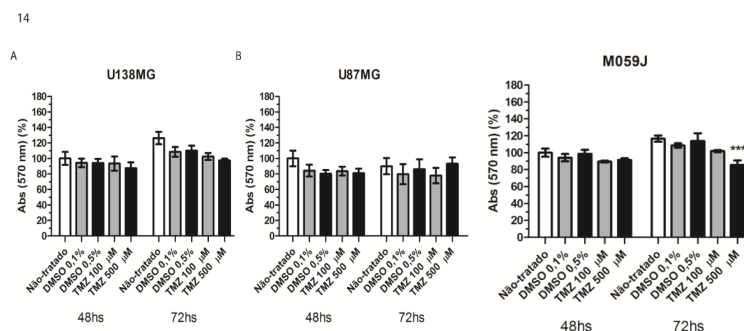


## 4.3 Efeito de TMZ na viabilidade celular e no conteúdo de NBS1 nas linhagens U87MG, U138MG e M059J

TMZ é um agente alquilante que demonstrou aumentar a sobrevivência de pacientes

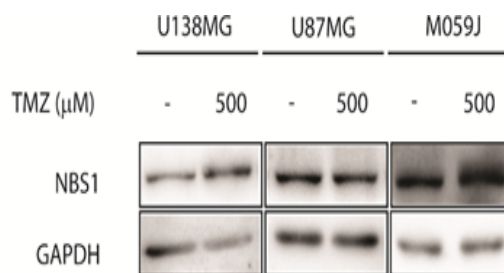
de GBM, em combinação com radioterapia (STUPP, 2010). No presente estudo, após 72 h de exposição às concentrações de 100 e 500  $\mu$ M de TMZ, células U138MG e U87MG não apresentaram alteração de viabilidade (Figuras 4A e 4B), enquanto células M059J apresentaram redução de 15% na viabilidade celular (Figura 4C).

**Figura 4 – Viabilidade de U138MG, U87MG e M059J em resposta a TMZ.**



O conteúdo proteico de NBS1 foi avaliado após 48 h de tratamento com TMZ e nenhuma das linhagens apresentou alteração nos níveis dessa proteína, por nenhuma concentração da droga (Figura 5).

**Figura 5 – Níveis de NBS1 após tratamento com TMZ**

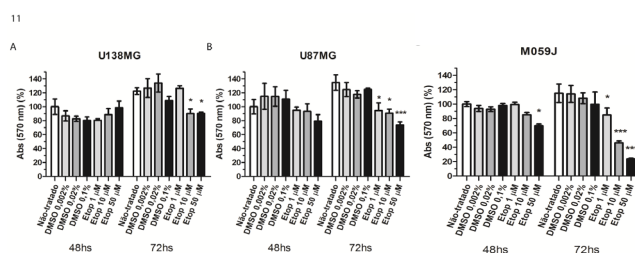


#### 4.6 Efeito de etoposídeo na viabilidade celular e no conteúdo de NBS1 nas linhagens U87MG, U138MG e M059J

Como agente indutor de DSB alternativo à radiação ionizante, foi utilizado no presente estudo o quimioterápico etoposídeo para se avaliar a relativa resistência entre linhagens de GBM à quimioterapia. Embora etoposídeo não seja uma droga de primeira linha contra GBM, ele produz danos de DNA semelhantes à radiação ionizante, através da inibição da enzima topoisomerase II. A linhagem U138MG apresentou menor redução de viabilidade após 72 h de tratamento com etoposídeo (redução de aproximadamente 10% com as doses de 10 e 50  $\mu$ M) (Figura 6A). A linhagem U87MG apresentou redução de 6%, 10% e 27% de viabilidade pelas

doses de 1, 10 e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente, após 72 h de tratamento com a droga (Figura 6B). De modo semelhante ao observado nos experimentos de exposição à radiação ionizante, células da linhagem M059J também apresentaram maior sensibilidade ao tratamento quando comparada às outras. Após 48hs de incubação com etoposídeo, foi observada redução de 29% na viabilidade celular desta linhagem na dose de 50  $\mu\text{M}$ . Em 72hs, a viabilidade das células M059J foi reduzida em aproximadamente 26%, 54% e 77% com as doses de 1, 10 e 50  $\mu\text{M}$  de etoposídeo, respectivamente (Figura 6C). Todavia, nenhuma das linhagens apresentou mudança dos níveis de NBS1 após tratamento com 1  $\mu\text{M}$  ou 10  $\mu\text{M}$  de etoposídeo (dados não mostrados).

**Figura 6** – Viabilidade de U138MG, U87MG e M059J em resposta a etoposídeo



## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar se diferentes agentes terapêuticos alteram os níveis de NBS1 e c-Myc em linhagens de glioblastoma. Um estudo prévio de alta repercussão demonstrou que GSCs ativam exacerbadamente a cascata de ATM após irradiação, quando comparadas às células não-tronco isoladas dos mesmos tumores, e sugeriu que isto desempenha papel-chave na radiorresistência desta subpopulação (BAO, 2006). Essa resposta exacerbada decorreria do aumento de c-Myc por radiação ionizante e um consequente aumento transcricional de NBS1, conforme sugerido por um estudo posterior (CHENG, 2011).

Os resultados aqui apresentados demonstram que as linhagens U138MG, U87MG e M059J se comportam de modo diferente de células-tronco de GBM no que tange ao conteúdo de NBS1 e c-Myc após exposição à radiação ionizante. O presente estudo verificou que o conteúdo proteico de c-Myc é reduzido após irradiação nas linhagens de GBM U138MG, U87MG e M059J. Ao contrário do que foi observado por estudos anteriores em GSCs, a modulação de c-Myc nessas células não demonstra estar relacionado à sensibilidade dessas linhagens à radiação ionizante. Contudo, células-tronco de GBM se apresentaram mais sensíveis à radiação ionizante do que as linhagens estabelecidas U87MG, U251 e SF126 (McCORD, 2009). Curiosamente, outro estudo verificou que

elevada proporção de células-tronco de GBM em amostras histológicas destes tumores se correlacionava com maior sobrevida dos pacientes (PALLINI, 2011). Tomados em conjunto, estes resultados prévios sugerem que a resistência de GBM ao tratamento possa também ser governada por mecanismos que diferem daqueles observados em células-tronco deste tumor. A diferença de sensibilidade à radiação ionizante observada entre GSCs e linhagens de GBM sugere a atuação de distintos mecanismos moleculares de resposta ao estresse genotóxico nestas células (McCORD, 2009).

Os resultados obtidos no presente trabalho também demonstram que não há alteração de conteúdo de NBS1 nem relação com os fenótipos de perda de viabilidade celular por irradiação nas linhagens U138MG, U87MG e M059J, ao contrário do que foi demonstrado para células-tronco de GBM em comparação com células não-tronco derivadas de mesmo tumor (CHENG, 2011). O papel de NBS1 na resposta a irradiação em células de outros tipos de câncer já foi analisado através de perda de função, apresentando-se tanto pró-apoptótico quanto radioprotetor dependendo do tipo celular (ZHANG, 2007). Além de ter sido demonstrado nestas células tumorais, o aumento do nível proteico de NBS1 por radiação ionizante também foi observado em fibroblastos humanos (GUERRA, 2010). No entanto, o mecanismo molecular responsável por esse efeito ainda não foi totalmente elucidado. O não incremento do conteúdo proteico de NBS1 não necessariamente denota em falta de contribuição da proteína na resistência ao agente genotóxico, uma vez que ela também passa por modificações como fosforilação, acetilação e ubiquitinação (KOMATSU, 2016).

O aumento de nível proteico de c-Myc após irradiação foi observado em células-tronco de GBM e foi sugerido que isto teria grande contribuição para a radioresistência destas células (CHENG, 2011). Aqui, foi observado que c-Myc não é modulado por radiação ionizante nas três linhagens após irradiação. Contudo, nas linhagens U138MG, U87MG e M059J há tendência de redução de c-Myc. Não se pode excluir a possibilidade de que as tendências observadas estejam relacionadas a parada no ciclo celular ocasionada por irradiação, e não por mecanismos de regulação desta proteína como resposta ao estresse genotóxico. A análise de como a radiação ionizante afeta a progressão no ciclo celular nestas linhagens permitiria tal correlação. Ademais, os dados aqui apresentados mostram que estas linhagens divergem das células-tronco de GBM quanto à modulação do conteúdo de c-Myc por irradiação (CHENG, 2011). Havendo uma tendência de redução, a expressão de micro-RNAs regulatórios de c-Myc poderia ser investigada nestas linhagens pós-irradiação, com intuito de evidenciar a base mecanística para a modulação desta oncoproteína por agentes terapêuticos de glioblastoma, assim como tem sido investigado para outros fatores de resistência (MØLLER, 2013). Pode ser que estes RNAs regulatórios

tenham as expressões alteradas por radiação nestas células.

Dentro deste panorama, a compreensão dos eventos moleculares desencadeados pelos diversos agentes terapêuticos é crucial para o desenvolvimento racional de novos fármacos de sua concepção até as fases clínicas de pesquisa. Os resultados aqui apresentados foram publicados em artigo original de pesquisa (RODRIGUES, 2018).

## REFERÊNCIAS

- BAO, S. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 756-60, dez. 2006.
- BARTEK, Jiri; LUKAS, Jiri. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**, v. 3, p. 421-429, mai. 2003.
- BERKOVICH, Elijah; MONNAT JR, Raymond J.; KASTAN, Michael B. Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 683-90, mai. 2007.
- CEROSALETTI, Karen; WRIGHT, Jocyntra; CONCANNON, Patrick. Active role for nibrin in the kinetics of atm activation. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 5, p. 1691-9, mar. 2006.
- CHEHAB, Nabil H. et al. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. **Genes & Dev**, v. 14, p. 278-288, fev. 2000.
- CHENG, L. et al. L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. **EMBO J**, v. 30, n. 5, p. 800-13, fev. 2011.
- CHIANG, Y. C. et al. c-Myc directly regulates the transcription of the NBS1 gene involved in DNA double-strand break repair. **J Biol Chem**, v. 278, n. 21, p. 19286-91, mai. 2003.
- CICCIA, Alberto; ELLEDGE, Stephen J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, out. 2010.
- COHEN, Martin. H.; JOHNSON, John R.; PAZDUR, Richard. Food and Drug Administration Drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 19 Pt 1, p. 6767-71, out. 2005.
- CUI, F. et al. The involvement of c-Myc in the DNA double-strand break repair via regulating radiation-induced phosphorylation of ATM and DNA-PKcs activity. **Mol Cell Biochem**, v. 406, n. 1-2, p. 43-51, ago. 2015.
- DAL-PIZZOL, F. et al. Modulation of oxidative stress in response to gamma-radiation in human glioma cell lines. **J Neurooncol**, v. 61, p. 89-94, jan. 2003.
- EICH, M. et al. Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 11, p. 2529-40, nov. 2013
- FENG, W. et al. Replication stress-induced chromosome breakage is correlated with replication fork progression and is preceded by single-stranded DNA formation. **G3 (Bethesda)**, v. 1, n. 5, p. 327-35, out. 2011.
- GUERRA, L. et al. Myc is required for activation of the ATM-dependent checkpoints in response to DNA damage. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8924, jan. 2010.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, jan. 2000.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, mar. 2011.



- HELLEDAY, Thomas et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 3, p. 193-204, mar. 2008
- HIRAO, Atsushi et al. Chk2 Is a Tumor Suppressor That Regulates Apoptosis in both an Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)-Dependent and an ATM-Independent Manner. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 18, p. 6521-6532, set. 2002.
- JACKSON, Stephen P.; BARTEK, Jiri. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-8, out. 2009.
- KASTAN, M. B. et al. A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and GADD45 Is Defective in Ataxia-Telangiectasia. **Cell**, v. 71, p. 587-597, nov. 1992.
- KOMATSU, Kenshi. NBS1 and multiple regulations of DNA damage response. **J Radiat Res**, sup. 57, ago. 2016.
- KRESS, Teresia R.; SABO, Arianna; AMATI, Bruno. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. **Nat Rev Cancer**, v. 15, n. 10, p. 593-607, out. 2015.
- LEES-MILLER, S. P. et al. Absence of p350 Subunit of DNA-Activated Protein Kinase from a Radiosensitive Human Cell Line. **Science**, v. 267, p. 1183-1185, fev. 1995.
- MARAMPON, F. et al. Hypoxia sustains glioblastoma radioresistance through ERKs/DNA-PKcs/HIF-1alpha functional interplay. **Int J Oncol**, v. 44, n. 6, p. 2121-31, mar. 2014.
- MATSUOKA, Shuhei. et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. **Science**, v. 316, n. 5828, p. 1160-6, mai. 2007.
- MIRZOEVA, O. K.; KAWAGUCHI, T.; PIEPER, R. O. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex interacts with the mismatch repair system and contributes to temozolomide-induced G2 arrest and cytotoxicity. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 11, p. 2757-66, nov. 2006
- NITISS, John L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 5, p. 338-50, mai. 2009.
- PALLINI, R. et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. **Cancer**, v. 117, n. 1, p. 162-74, ago. 2011.
- PAULL, Tanya T. Mechanisms of ATM Activation. **Annu Rev Biochem**, v. 84, p. 711-38, jan. 2015.
- RILEY, Todd. et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 5, p. 402-12, mai. 2008.
- ROPOLO, M. et al. Comparative analysis of DNA repair in stem and non-stem glioma cell cultures. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 3, p. 383-92, mar. 2009.
- RODRIGUES, P. M. G. et al. Regulation of c-Myc and NBS1 by ionizing radiation in glioblastoma cells. **Oncology Signaling**, v. 1, n. 1, p. 1-5, jun. 2018.
- SHIEH, Sheau-Yann et al. DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. **Cell**, v. 91, p. 325-334, out. 1997.
- SON, M. J. et al. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 5, p. 440-52, mai. 2009.
- STUPP, R. et al. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, v. 21 Suppl 5, p. v190-3, mai. 2010.
- STUPP, R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, p. 987-996, mar. 2005.
- WANG, W. J. et al. MYC regulation of CHK1 and CHK2 promotes radioresistance in a stem cell-like population of

nasopharyngeal carcinoma cells. **Cancer Res**, v. 73, n. 3, p. 1219-31, fev. 2013.

WELLER, Michael et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 9, p. e395-e403, ago. 2014.

ZHANG, Y. et al. The effects of NBS1 knockdown by small interfering RNA on the ionizing radiation-induced apoptosis in human lymphoblastoid cells with different p53 status. **Toxicol Lett**, v. 171, n. 1-2, p. 50-9, jun. 2007.

## THE REGULATION OF DNA DAMAGE SIGNALING PATHWAYS BY THERAPEUTIC AGENTS IN GLIOBLASTOMA

**Abstract** – Genotoxic agents are widely used as therapeutic agents against cancer due their capability to induce DNA damage response (DDR). DDR comprises from cell cycle arrest to repair of the lesions or to cell death in response to them. Among the DDR molecular pathways, the pathway mediated by MRE11/RAD50/NBS1 and ATM signaling demonstrates to have a key role in glioblastoma (GBM) resistance to ionizing radiation. It has been demonstrated that in GBM cancer stem-cells ionizing radiation increases NBS protein levels and activates exaggeratedly ATM pathway, in comparison with other cells isolated from the same tumor specimens. However, in previous studies some established GBM cell lines demonstrated to be more resistant to different genotoxic agents than GBM cancer stem-cells. The aim of the present study was to evaluate whether there is increase of NBS1 in GBM established cell lines and whether it is correlated to sensibility to therapeutic agents. Here, M059J cell line showed greater reduction of viability after exposition to ionizing radiation, temozolomide (TMZ) and etoposide, in comparison to U87MG and U138MG cell lines. It was verified that NBS1 content is not altered in any cell line by any genotoxic agents. Nevertheless, the protein level of c-Myc transcription factor was reduced in the three cell lines after irradiation. Taken together, these results suggest that other DDR pathways are involved in GBM therapeutic resistance. In addition, data here presented indicate that not only cancer stem-cells subpopulations could contribute to tumoral recurrence.

**Keywords:** glioblastoma, DNA damage response, ionizing radiation, temozolomide.

# CAPÍTULO 4

## CONCILIANDO MORFOLOGIA E MOLÉCULAS EM RECONSTRUÇÕES DA HISTÓRIA EVOLUTIVA DE PROTISTAS CILIADOS

**Noemi Mendes Fernandes**

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

<http://lattes.cnpq.br/4423153087027943>

**RESUMO** – Estudos de evolução molecular de protistas ciliados são baseados quase exclusivamente em genes ribossomais, os quais, frequentemente, recuperam árvores filogenéticas que divergem da tradicional sistemática morfológica. Tais filogenias geralmente apresentam baixa resolução, principalmente dos nós mais profundos, falhando em recuperar as relações evolutivas entre linhagens com tempos de divergência mais antigos. O presente capítulo introduz os conflitos entre a classificação tradicional e filogenias baseadas em dados moleculares em Ciliophora e apresenta uma abordagem que foi adotada para melhorar a compreensão da história evolutiva dos grupos internos da classe Heterotrichea, utilizando sequências de cinco marcadores moleculares e dados morfológicos em análises filogenéticas combinadas. O conceito de coalescência multiespécies foi aplicado, pela primeira vez em Ciliophora, para modelar as discrepâncias entre as árvores de genes, causadas por efeitos como distribuição incompleta de linhagens ou *incomplete lineage sorting*. Os resultados revelaram que: (1) as árvores de genes são

inconsistentes quanto a posição filogenética de algumas famílias de heterotríqueos; (2) a árvore inferida usando o modelo de coalescência multiespécies é consistente com filogenias baseadas no gene 18S-rDNA, suportando Spirostomidae como a linhagem que divergiu primeiro do ancestral comum dos atuais heterotríqueos. A concatenação dos dados morfológicos e moleculares foi eficaz na resolução dos nós internos da filogenia de Heterotrichea, apresentando hipóteses estatisticamente mais plausíveis e robustas sobre a evolução das linhagens desta classe.

**Palavras-chave:** ciliados, eucariontes unicelulares, evolução molecular, filogenia, protistas.

### 1. INTRODUÇÃO

O filo Ciliophora Doflein, 1901 é classificado dentro de Alveolata, uma das mais diversificadas linhagens de protistas, a qual inclui também Dinoflagellata e Apicomplexa (ADL *et al.*, 2019). São organismos heterotróficos, caracterizados por possuir cílios para locomoção e alimentação em pelo menos um dos estágios do ciclo de vida (LYNN, 2008). Outra característica dos ciliados é o dualismo nuclear, ou seja, eles possuem macronúcleo e micronúcleo com

material genético e funções distintas. O macronúcleo é poliploide e regula principalmente funções somáticas, como síntese de RNA e ontogênese. O micronúcleo é diploide e torna-se ativo apenas durante a reprodução sexuada, também chamada conjugação, quando dois indivíduos se unem temporariamente para troca de micronúcleos (CORLISS, 1979).

Os ciliados possuem morfologia complexa, a qual pode ser revelada e estudada por diversos métodos, especialmente por técnicas de impregnação pela prata (p. e. DIECKMANN, 1995) e por microscopia eletrônica de varredura e transmissão (LYNN, 2008). Estão globalmente distribuídos em uma ampla variedade de habitats, onde eles atuam como componentes fundamentais em redes tróficas (FINLAY e FENCHEL, 1996): são encontrados em oceanos, como parte do plâncton (de Vargas *et al.*, 2015) e no sedimento (HAUSMANN *et al.*, 2002); em lagos, rios, riachos e poços de água doce (KAMMERLANDER *et al.*, 2015); em lagoas hipersalinas (YASINDI *et al.*, 2002); em ambientes terrestres, como solos, em associação com musgos, em pequenas poças formadas por folhas de plantas e em tanques de bromeliáceas (DURÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2015). Os ciliados ocupam diversos nichos ecológicos, atuando como filtradores e consumidores de partículas em suspensão (FINLAY E FENCHEL, 1996). Se alimentam de bactérias, algas unicelulares e até mesmo de outros ciliados menores (LYNN, 2008).

## 2. MORFOLOGIA VERSUS MOLÉCULAS EM CILIOPHORA

A classificação tradicional de ciliados é fundamentada em caracteres morfológicos, como o padrão de ciliatura oral, organização da ciliatura somática, ultraestrutura do córtex, padrões morfogenéticos e dados morfométricos, além de características comportamentais e do ciclo de vida, entre outros (LYNN, 2008). Com o aprimoramento de técnicas moleculares de amplificação e sequenciamento de DNA e o uso de sequências nucleotídicas para inferir relações de parentesco entre ciliados, iniciado principalmente por SOGIN e ELWOOD (1986), a sistemática de Ciliophora passou por várias fases de reinterpretações e reformulações. O gene nuclear codificador da pequena subunidade ribossomal (18S-rDNA) tem sido desde então usado como o principal *locus* em inferências de filogenias em Ciliophora, visto que ele fornece apropriado sinal filogenético e pode ser sequenciado de forma simples e acuradamente (WOESE, 1987). Embora a classificação morfológica e a genealogia do 18S-rDNA sejam congruentes em alguns aspectos, como por exemplo na divisão de Ciliophora nos dois subfilos Postciliodesmatophora e Intramacronucleata (GAO e KATZ, 2014), topologias baseadas neste gene reformularam a compreensão acerca das relações de parentesco de grupos internos de Ciliophora, revelando novos clados, adicional diversidade dentro de táxons bem definidos, a existência de espécies crípticas e inúmeros agrupamentos polifiléticos e parafiléticos (STOECK

*et al.*, 2007; DEL CAMPO *et al.*, 2013). Adicionalmente, análises utilizando sequências do gene 18S-rDNA elucidaram a posição filogenética de alguns gêneros considerados morfologicamente enigmáticos, como *Phacodinium* (SHIN *et al.*, 2000), *Schizocaryum* e *Licnophora* (LYNN e STRÜDER-KYPKE, 2002).

Alguns táxons de ciliados compõe agrupamento monofilético em filogenias do gene 18S-rDNA, porém não foram detectadas sinapomorfias morfológicas que justifiquem o posicionamento filogenético destes táxons em um mesmo clado. Estes agrupamentos foram então denominados “riboclasses” (LYNN, 2003), como por exemplo os gêneros *Plagiopyla*, *Lechriopyla* e *Trimyema* que foram classificados como pertencentes à riboclasse PLAGIOPYLEA e os gêneros *Nyctotherus* e *Metopus*, que se agrupam com outros gêneros constituindo a riboclasse ARMOPHOREA (LYNN, 2008).

Contudo, por ser altamente conservado, análises baseadas unicamente no gene 18S-rDNA não são suficientes para esclarecer relacionamentos filogenéticos à nível de famílias, gêneros e entre espécies de ciliados. Recentemente, o gene 28S-rDNA e a região de espaçadores internos ribossomais ITS1-5.8S-ITS2 estão sendo considerados bons marcadores em estudos de filogenia destes organismos (LYNN, 2008), e geralmente apresentam resultados diferentes daqueles observados em análises baseadas em um único *locus*. Outro marcador que tem sido utilizado para classificar espécies de ciliados é o gene mitocondrial que codifica a subunidade I da enzima citocromo oxidase (COI). Este gene possui taxas de evolução mais aceleradas em comparação com genes ribossomais e tem se mostrado eficaz na diferenciação entre morfoespécies próximas (STRÜDER-KYPKE e LYNN, 2010; HEGER *et al.*, 2011). Por esse motivo, COI tem sido frequentemente considerado ideal para barcoding de ciliados e outros organismos (ZHAO *et al.*, 2013; KOSAKYAN *et al.*, 2015). No entanto, um fator limitante para a utilização de genes mitocondriais para a elucidação da história evolutiva do filo Ciliophora como um todo, é que alguns táxons anaeróbicos não possuem mitocôndrias, como Plagiopylida e Armophorea. As mitocôndrias nestes organismos foram substituídas por bactérias metanogênicas endossimbiontes ou hidrogenossomos, que anaerobicamente oxidam piruvato em acetato e CO<sub>2</sub>, produzindo hidrogênio molecular e ATP (MÜLLER, 1993).

O gene codificador da extremidade 5' (região D1-D2) da grande subunidade ribossomal (28S-rDNA) vem sendo utilizado como marcador alternativo para *barcoding* molecular em Ciliophora. Este *locus* tem se mostrado adequado para discriminação entre morfoespécies próximas, distinguindo inclusive espécies crípticas (GENTEKAKI e LYNN, 2009). Este marcador também é comumente utilizado para complementar filogenias baseadas no gene 18S-rDNA em alguns grupos de Ciliophora (MOREIRA *et al.*, 2007). No entanto, o número de espécies de ciliados com sequências deste marcador disponíveis ainda é muito reduzido.

Análises filogenômicas apresentam melhores resoluções, refletidas em maior suporte estatístico dos cladogramas, quando comparadas com filogenias baseadas em um único *locus* para Ciliophora (p. e. WANG *et al.*, 2021). Os genes possuem diferentes taxas evolutivas e, por isso, árvores de genes podem reconstruir histórias evolutivas distintas (MADDISON, 1997). As possíveis discrepâncias entre árvores de genes e árvore de espécies são consequências de processos evolutivos tais como duplicação/perda gênica, transferência horizontal, hibridização, introgressão e *incomplete lineage sorting* (DEGNAN e ROSENBERG, 2009; KUBATKO *et al.*, 2011; ver próximo tópico). Por isso, a utilização de múltiplos marcadores é fundamental para uma melhor compreensão acerca da origem e evolução das espécies.

Em ciliados, quando surgem discrepâncias entre evidências morfológicas e moleculares, morfologistas geralmente argumentam que árvores de genes não representam acurada inferência de filogenia (AGATHA, 2004; FOISSNER *et al.*, 2004). Por outro lado, sistematas moleculares afirmam que eles utilizam um número maior de informações em reconstruções filogenéticas e, adicionalmente, sugerem hipóteses alternativas de evolução morfológica (SHAZIB *et al.*, 2014; VĚAČNÝ *et al.*, 2014). De forma geral, grupos de ciliados morfológicamente delimitados podem ser fundamentados em uma mistura de estados de caracteres ancestrais, derivados e convergentes. Portanto, moléculas são ferramentas necessárias para compreender a história evolutiva das espécies e suas características morfológicas.

### 3. O MODELO DA COALESCÊNCIA MULTIESPÉCIES

Além das incongruências entre morfologia e moléculas frequentemente observadas em estudos evolutivos, existem também discordâncias entre árvores filogenéticas inferidas com diferentes genes. Com o aumento dos estudos envolvendo análises multigênicas, surgiu a necessidade de investigações sobre as possíveis causas de divergências entre genealogias e assim, novas teorias e ferramentas foram desenvolvidas, usando principalmente modelos probabilísticos. A teoria da coalescência (HUDSON, 1983; DEGNAN e ROSENBERG, 2009) foi elaborada neste contexto, sendo o processo mais utilizado para modelar a variação entre árvores de genes devido a sua simplicidade matemática (LIU *et al.*, 2009). Resumidamente, a coalescência (coalescência = aderência, junção), pode ser conceituada como o processo que traça a ancestralidade de um conjunto de cópias de um gene a partir do presente, até o ponto onde essas cópias encontram sua ancestral, ou seja, coalescem (LIU *et al.*, 2009). Em outras palavras, o evento de coalescência ocorre quando um par de cópias gênicas encontram seu ancestral comum, o que corresponde aos nós nas árvores de genes (DEGNAN e ROSENBERG, 2009).

Estudos teóricos e simulações demonstraram que o modelo de coalescência pode



produzir filogenias acuradas a partir de análises multigênicas, que possivelmente estão sujeitas à *incomplete lineage sorting* (ILS), considerada como a maior causa da heterogeneidade topológica entre árvores de genes (EDWARDS, 2009; LIU *et al.*, 2008). O fenômeno *incomplete lineage sorting* ocorre logo após um evento de especiação, quando as novas linhagens ainda não tiveram tempo suficiente para se fixarem. O termo *incomplete lineage sorting* é usado com diferentes significados. Alguns autores usam ILS como sinônimo de incongruências entre genealogias ou como o processo que explica as discordâncias entre elas (DEGNAN e ROSENBERG, 2009). Outros assumem que 'lineage sorting' é completa quando não existem polimorfismos para um determinado *locus* em populações descendentes de uma mesma população ancestral (MASTA e MADDISON, 2002; FUNK e OMLAND, 2003). Contudo, outros fenômenos também podem gerar discordâncias topológicas entre árvores de genes e árvore de espécies, como transferência horizontal de genes (HGT), duplicação ou perda gênica, hibridização e recombinação (DEGNAN e ROSENBERG, 2009).

O modelo da coalescência assume que: (1) incongruências entre árvores de genes e a filogenia da espécie são exclusivamente devido ao processo de coalescência; (2) que existe livre recombinação entre genes, mas nenhuma recombinação dentro de cada gene; (3) que os alelos não estão sob seleção; (4) que o processo de mutação ao longo das linhagens nas árvores de genes segue um modelo evolutivo; (5) que as sequências em um único *locus* são independentes da árvore de espécies; e (6) que árvores de genes são mutuamente independentes (LIU *et al.*, 2009).

A coalescência multiespécies é o modelo de coalescência aplicado à múltiplas populações conectadas em uma filogenia (Figura 1). Ela funciona como uma generalização do modelo Wright-Fisher para deriva genética (FISHER, 1930; WRIGHT, 1931), o qual assume que o tamanho da população é constante, as gerações não se sobrepõem e os cruzamentos ocorrem totalmente ao acaso (seleção natural é inoperante). A coalescência multiespécies une vários eventos de coalescência que ocorrem nas populações individuais, para compor a árvore de espécies (Figura 1).

Em Ciliophora, apesar de vários estudos utilizarem multigenes em inferências filogenéticas e a maioria revelar incongruências entre as topologias obtidas (p. e. SHAZIB *et al.*, 2014), nenhum estudo, até então, utilizou o método de coalescência multiespécies para deduções de árvores de espécies. Geralmente, assume-se que a filogenia das espécies é aquela obtida com o gene mais representativo (em número de táxons) e que mais se aproxima da classificação morfológica. Estudos que discutem teoricamente sobre as possíveis causas de discordâncias entre genealogias também são inexistentes. Este foi o primeiro estudo a introduzir o método de coalescência multiespécies em inferências filogenéticas para uma

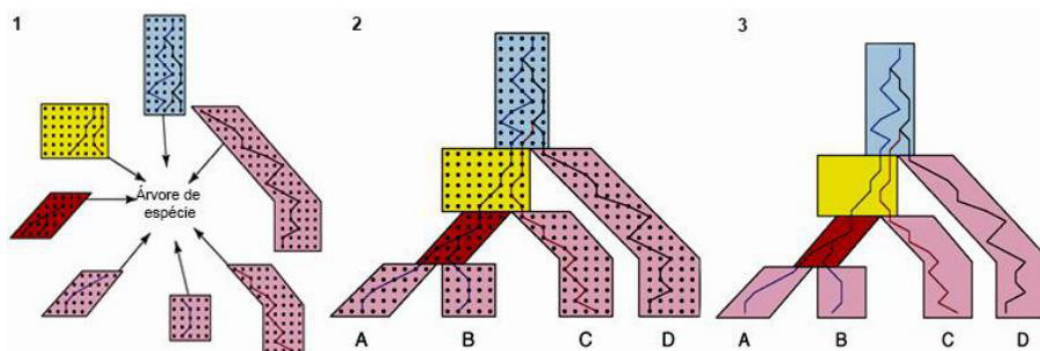


classe de Ciliophora.

#### 4. ANÁLISE DE EVIDÊNCIAS TOTAIS, COALESCÊNCIA E FILOGENIA DE HETEROTRICHEA

EERNISSE e KLUGE (1993) propuseram que as análises filogenéticas deveriam sempre ser executadas usando todas as evidências disponíveis. Essa abordagem ficou conhecida como “total-evidence” a qual utiliza matrizes contendo dados moleculares e morfológicos e permite o uso de métodos probabilísticos em estimativas filogenéticas (RONQUIST *et al.*, 2012). Essa abordagem é geralmente recomendada, uma vez que ela explora o poder explicativo e informativo de todos os dados utilizados nas análises e tem se tornado popular, principalmente para adicionar informações morfológicas de fósseis em estudos de datação molecular (p. e. SCHRAGO *et al.*, 2013).

**Figura 1** – O modelo da coalescência multiespécies. Cada ponto representa uma cópia individual de um gene e cada coluna horizontal representa uma geração. As linhas conectam as cópias individuais à seus ancestrais na geração anterior. O número de pontos na horizontal representa o tamanho da população e na vertical, o tempo em gerações. (1) O processo de coalescência ocorrendo em várias populações isoladamente. As populações coloridas em rosa possuem apenas uma cópia gênica. (2) História evolutiva das populações. Uma vez que a cópia ancestral do gene na população C falhou em coalescer na população em amarelo, tal cópia gênica pode coalescer com a linhagem D antes de coalescer com a linhagem ancestral de A e B. Consequentemente, a árvore do gene (linhas internas) será diferente da árvore das espécies (topologia)



Fonte: modificada de DEGNAN e ROSENBERG (2009).

Para avaliar hipóteses de evolução e relacionamento filogenético de grupos internos da classe Heterotrichea (Figura 2), foram usadas sequências de cinco marcadores moleculares: os genes codificadores da pequena subunidade ribossomal 18SrDNA e da região hipervariável D1-D2 da grande subunidade ribossomal 28S-rDNA, sequências da região de espaçadores

internos ribossomais ITS1-5.8S-ITS2 e os genes codificadores das proteínas citocromo oxidase I (COI) e alfa-tubulina. Dados morfológicos foram integrados aos dados moleculares para obtenção de hipóteses evolutivas mais consistente, usando evidências totais.

Resumidamente, vinte espécies de heterotríqueos foram obtidas a partir de 31 pontos de amostragem no Brasil, Inglaterra, Alemanha, Itália e Venezuela (para detalhes sobre a metodologia, veja FERNANDES *et al.*, 2016). O DNA total de cada espécie foi extraído, purificado e os genes-alvo foram amplificados usando primer específicos. Produtos de PCR dos genes ribossomais foram purificados e diretamente sequenciados. Clonagem molecular foi realizada para detectar polimorfismos em sequências do gene COI ou possíveis parálogos em sequências do gene alfa-tubulina. Os fragmentos obtidos foram importados para o software Geneious 7.1.7 e montados em *contigs*. Em seguida, as sequências obtidas foram manualmente verificadas para remoção de bases ambíguas ou de baixa qualidade. Para estabelecimento das matrizes moleculares analisadas neste estudo, sequências homólogas dos genes-alvo para todas as espécies de heterotríqueos disponíveis no GenBank foram obtidas.

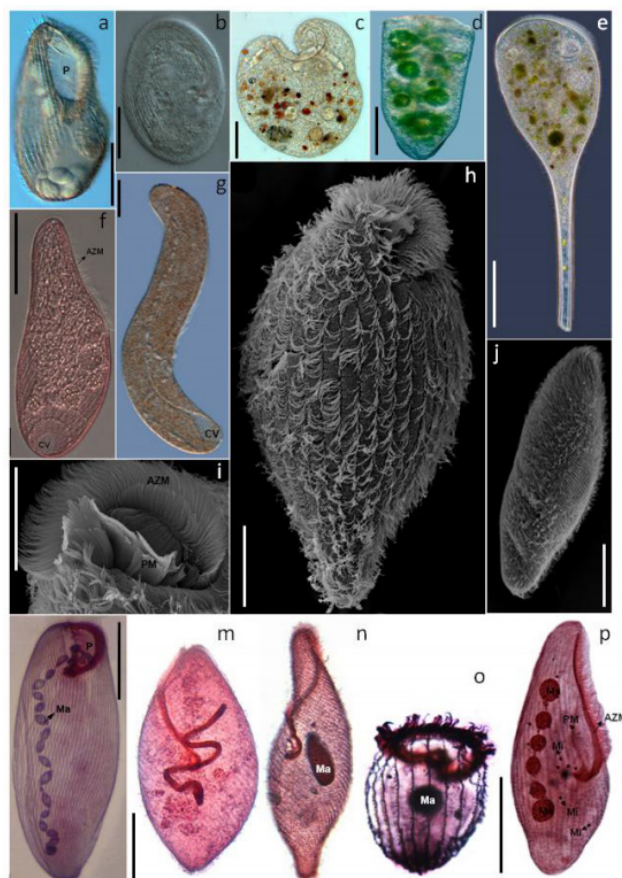
Alinhamentos das sequências foram conduzidos no SINA *web aligner* e com T-Coffee. Após obtenção das matrizes alinhadas, análises filogenéticas de máxima-verossimilhança e inferência bayesiana foram implementadas (detalhes em FERNANDES *et al.*, 2016). O método STAR (*Species Trees using Average Ranks of gene coalescence times*; LIU *et al.*, 2009), baseado no modelo de coalescência multiespécies foi usado para estimar a árvore de espécies. Este método é baseado no padrão de divergências observado nas árvores genealógicas, permitindo que cada *locus* tenha diferentes histórias evolutivas (ZHONG *et al.*, 2013). A árvore das espécies STAR foi obtida no servidor web STRAW (SHAW *et al.*, 2013).

A matriz morfológica incluiu 37 caracteres binários/multi-estados não polarizados, representando características chave de heterotríqueos. Tal matriz foi concatenada aos dados moleculares para inferência da árvore bayesiana de evidências totais (FERNANDES *et al.*, 2016). Para identificação de sinapomorfias morfológicas, os caracteres foram mapeados na árvore de evidências totais.

Uma questão frequente em inferências filogenéticas de Heterotrichea era a falta de resolução dos nós internos profundos (*deep nodes*), o que é, possivelmente, a causa das divergências entre topologias inferidas usando os mesmos genes (p. e. SHAZIB *et al.*, 2014). No presente estudo, as árvores de genes foram inconsistentes quanto a posição filogenética de algumas famílias de heterotríqueos. A árvore inferida usando o modelo de coalescência multiespécies é consistente com filogenias baseadas no gene 18S-rDNA, suportando Spirostomidae como a linhagem que divergiu primeiro do ancestral comum dos atuais heterotríqueos. A concatenação de todos os dados moleculares e morfológicos para a

inferência da árvore de evidências totais melhorou a resolução dos nós internos, a qual refletiu em mais altos valores de suporte estatístico dos ramos que sustentam as principais linhagens de heterotríqueos (Figura 3). Adicionalmente, a utilização de caracteres morfológicos nas análises elucidou as razões da inconsistência entre a sistemática baseada na morfologia e filogenias moleculares de Heterotrichea, a qual pode ser explicada pela existência de uma grande quantidade de caracteres homoplásticos que são utilizados para classificação dos heterotríqueos (Figura 2).

**Figura 2** – Representantes da classe Heterotrichea. (a-g) Imagens *in vivo*; (h-j) Microscopia eletrônica de varredura (MEV); (l-p) Método de impregnação pela prata (protargol). (a, h, l) *Condylostoma arenarium*; (b) *Peritromus faurei*; (c) *Condylostentor auriculatus*; (d) *Stentor polymorphus*; (e) *Stentor coeruleus*; (f, p) *Blepharisma sinuosum*; (g) *Spirostomum ambiguum*; (i) ampliação da região oral de *Condylostoma arenarium*; (j, n) *Spirostomum teres*; (m) *Spirostomum* sp.; (o) *Stentor igneus*. Siglas: AZM, zona adoral de membranelas; CV, vacúolo contrátil; Ma, macronúcleo; Mi, micronúcleo; PM, membrana paraoral; P, peristoma. Barra de escala: 100 µm



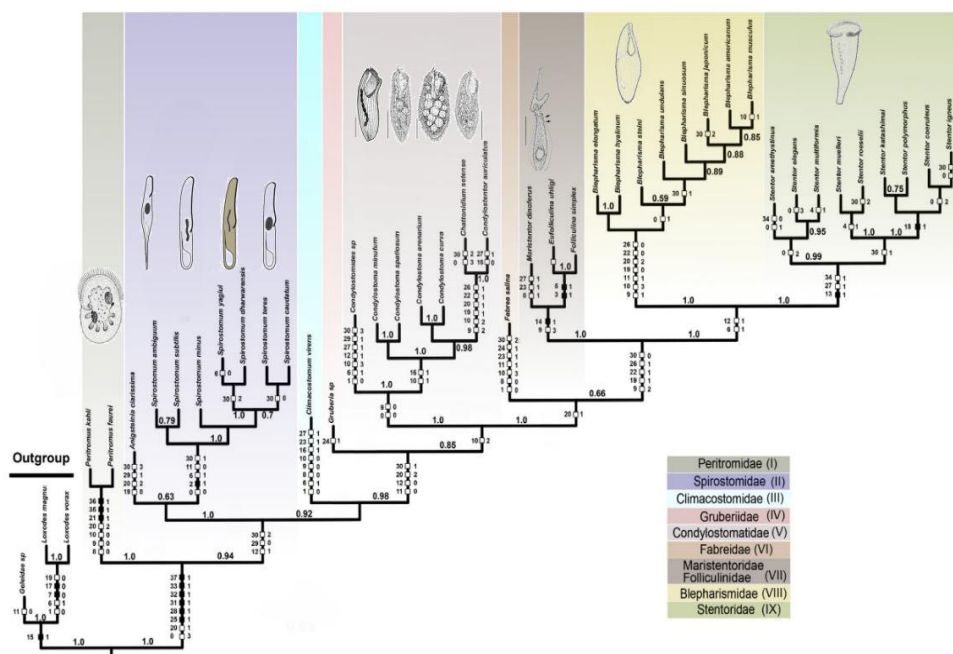
Fonte: Imagens de N. M. Fernandes e I. D. da Silva Neto.

O mapeamento dos caracteres morfológicos sobre a árvore de evidências totais revelou que as inconsistências entre a sistemática morfológica e as árvores moleculares de Heterotrichea podem ser explicadas pela ocorrência de homoplasias em diferentes níveis (FERNANDES *et al.*, 2016; Figura 3). Características da ciliatura oral são as principais candidatas para definir famílias de heterotríqueos.

### 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análises filogenéticas que conciliam dados de múltiplos marcadores moleculares e morfologia, aplicando a coalescência multiespécies para modelar as discrepâncias entre árvores de genes, apresentam melhores resoluções, refletida em maiores valores de suporte estatístico dos clados de Heterotrichea. Finalmente, a árvore de evidências totais revelou homoplasias morfológicas que dificilmente seriam descobertas fora do contexto de uma análise combinada. Esta abordagem mostrou-se altamente eficiente em reconstruções da história evolutiva dos ciliados heterotríqueos.

**Figura 3** – Árvore de evidências totais de Heterotrichea inferida com cinco marcadores moleculares e dados morfológicos. Os números nos ramos indicam as sinapomorfias morfológicas. Os quadrados pretos representam homologies secundárias e os quadrados brancos representam homoplasias. Ciliados karyorelicteos foram usados como grupo-externo



Fonte: adaptado de FERNANDES *et al.* (2016).

## REFERÊNCIAS

- ADL, S. M.; BASS, D.; LANE, C. E.; LUKEŠ, J.; SCHOCH, C. L.; SMIRNOV, A.; AGATHA, S.; BERNEY, C.; BROWN, M. W.; BURKI, F. (2019) **Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes**. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 4-119.
- AGATHA, S. (2004) **A Cladistic Approach for the Classification of Oligotrichid Ciliates (Ciliophora: Spirotricha)**. *Acta Protozoologica*, v. 43, n. 3, p. 201-217.
- CORLISS, J. (1979) **The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature - 2nd ed.**, Pergamon Press, New York, 455 p.
- DEGNAN, J. H.; ROSENBERG, N. A. (2009) **Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent**. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 24, n. 6, p. 332-340.
- DEL CAMPO, J.; NOT, F.; FORN, I.; SIERACKI, M. E.; MASSANA, R. (2013) **Taming the smallest predators of the oceans**. *The ISME Journal*, v. 7, n. 2, p. 351-358.
- DIECKMANN, J. (1995) **An improved protargol impregnation for ciliates yielding reproducible results**. *European Journal of Protistology*, v. 31, n. 4, p. 372-382.
- DURÁN-RAMÍREZ, C. A.; GARCÍA-FRANCO, J. G.; FOISSNER, W.; MAYÉN-ESTRADA, R. (2015) **Free-living ciliates from epiphytic tank bromeliads in Mexico**. *European Journal of Protistology*, v. 51, n. 1, p. 15-33.
- EDWARDS, S. V. (2009) **Is a new and general theory of molecular systematics emerging?** *Evolution*, v. 63, n. 1, p. 1-19.
- EERNISSE, D. J.; KLUGE, A. G. (1993) **Taxonomic congruence versus total evidence, and amniote phylogeny inferred from fossils, molecules, and morphology**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 10, n. 6, p. 1170-1195.
- FERNANDES, N. M.; PAIVA, T. A. S.; DA SILVA-NETO, I. D.; SCHLEGEL, M.; SCHRAGO, C. G. (2016) **Expanded phylogenetic analyses of the class Heterotrichea (Ciliophora, Postciliodesmatophora) using five molecular markers and morphological data**. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, v. 95, p. 229-246.
- FINLAY, B.; CORLISS, J.; ESTEBAN, G.; FENCHEL, T. (1996) **Biodiversity at the microbial level: the number of free-living ciliates in the biosphere**. *Quarterly Review of Biology*, p. 221-237.
- FISHER, R. A. (1930) **The Genetical Theory of Natural Selection**. Oxford, Clarendon Press, 272 p.
- FOISSNER, W. (2004) **Ubiquity and cosmopolitanism of protists questioned**. *SILnews*, v. 43, p. 6-7.
- FUNK, D. J.; OMLAND, K. E. (2003) **Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA**. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, p. 397-423.
- GAO, F.; KATZ, L. A. (2014) **Phylogenomic analyses support the bifurcation of ciliates into two major clades that differ in properties of nuclear division**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 70, n. 1, p. 240-243.
- GENTEKAKI, E.; LYNN, D. H. (2009) **High-level genetic diversity but no population structure inferred from nuclear and mitochondrial markers of the peritrichous ciliate *Carchesium polypinum* in the Grand River basin (North America)**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 10, p. 3187-3195.
- HAUSMANN, K.; HÜLSMANN, N.; POLIANSKI, I.; SCHADE, S.; WEITERE, M. (2002) **Composition of benthic protozoan communities along a depth transect in the eastern Mediterranean Sea**. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, v. 49, n. 11, p. 1959-1970.
- HEGER, T. J.; PAWLOWSKI, J.; LARA, E.; LEANDER, B. S.; TODOROV, M.; GOLEMANSKY, V.; MITCHELL, E. A. (2011) **Comparing potential COI and SSU rDNA barcodes for assessing the diversity and phylogenetic relationships of cyphoderiid testate amoebae (Rhizaria: Euglyphida)**. *Protist*, v. 162, n. 1, p. 131-141.
- HUDSON, R. R. (1983) **Testing the constant-rate neutral allele model with protein sequence data**. *Evolution*, p. 203-217.
- KAMMERLANDER, B.; BREINER, H. W.; FILKER, S.; SOMMARUGA, R.; SONNTAG, B.; STOECK, T. (2015) **High diversity of protistan plankton communities in remote high mountain lakes in the European Alps and the Himalayan mountains**. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 91, n. 4, p.10.



- KOSAKYAN, A.; MULOT, M.; MITCHELL, E. A.; LARA, E. (2015) **Environmental DNA COI barcoding for quantitative analysis of protists communities: A test using the *Nebela collaris* complex (Amoebozoa; Arcellinida; Hyalospheniidae)**. *European Journal of Protistology*, v. 51, n. 4, p. 311-320.
- KUBATKO, L. S.; GIBBS, H. L.; BLOOMQUIST, E. W. (2011) **Inferring species-level phylogenies and taxonomic distinctiveness using multilocus data in *Sistrurus rattlesnakes***. *Systematic Biology*, v. 60, n. 4, p. 393-409.
- LIU, L.; YU, L.; KUBATKO, L.; PEARL, D. K.; EDWARDS, S. V. (2009) **Coalescent methods for estimating phylogenetic trees**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 53, n. 1, p. 320-328.
- LIU, L.; PEARL, D. K.; BRUMFIELD, R. T.; EDWARDS, S. V. (2008) **Estimating Species Trees Using Multiple-Allele DNA Sequence Data**. *Evolution*, v. 62, n. 8, p. 2080-2091.
- LYNN, D. H. (2008) **The ciliated protozoa: characterization, classification, and guide to the literature**. Springer Science & Business Media, 605 p.
- LYNN, D. H. (2003) **Morphology or molecules: how do we identify the major lineages of ciliates (Phylum Ciliophora)**. *European Journal of Protistology*, v. 39, n. 4, p. 356-364.
- LYNN, D. H.; STRÜDER-KYPKE, M. (2002) **Phylogenetic position of *Licnophora*, *Lechriopyla*, and *Schizocaryum*, three unusual ciliates (phylum Ciliophora) endosymbiotic in echinoderms (phylum Echinodermata)**. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 49, n. 6, p. 460-468.
- MADDISON, W. P. (1997) **Gene trees in species trees**. *Systematic Biology*, v. 46, n. 3, p. 523-536.
- MASTA, S. E.; MADDISON, W. P. (2002) **Sexual selection driving diversification in jumping spiders**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 7, p. 4442-4447.
- MOREIRA, D.; VON DER HEYDEN, S.; BASS, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; CHAO, E.; CAVALIER-SMITH, T. (2007) **Global eukaryote phylogeny: combined small-and large-subunit ribosomal DNA trees support monophyly of Rhizaria, Retaria and Excavata**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 44, n. 1, p. 255-266.
- MÜLLER, M. (1993) **Review Article: The hydrogenosome**. *Microbiology*, v. 139, n. 12, p. 2879-2889.
- RONQUIST, F.; KLOPFSTEIN, S.; VILHELMOSEN, L.; SCHULMEISTER, S.; MURRAY, D. L.; RASNITSYN, A. P. (2012) **A total-evidence approach to dating with fossils, applied to the early radiation of the hymenoptera**. *Systematic Biology*, v. 61, n. 6, p. 973-999.
- SCHRAGO, C.; MELLO, B.; SOARES, A. (2013) **Combining fossil and molecular data to date the diversification of New World Primates**. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 26, n. 11, p. 2438-2446.
- SHAW, T. I.; RUAN, Z.; GLENN, T. C.; LIU, L. (2013) **STRAW: species TRee analysis web server**. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 1, p. 238-241.
- SHAZIB, S. U. A.; VĚAČNÝ, P.; KIM, J. H.; JANG, S. W.; SHIN, M. K. (2014) **Phylogenetic relationships of the ciliate class Heterotrichea (Protista, Ciliophora, Postciliodesmatophora) inferred from multiple molecular markers and multifaceted analysis strategy**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 78, p. 118-135.
- SHIN, M. K.; HWANG, U. W.; KIM, W.; WRIGHT, A. G.; KRAWCZYK, C.; LYNN, D. H. (2000) **Phylogenetic position of the ciliates *Phacodinium* (order Phacodiniida) and *Protocruzia* (subclass Protocruziida) and systematics of the spirotrich ciliates examined by small subunit ribosomal RNA gene sequences**. *European Journal of Protistology*, v. 36, n. 3, p. 293-302.
- SOGIN, M. L.; ELWOOD, H. J. (1986) **Primary structure of the *Paramecium tetraurelia* small-subunit rRNA coding region: Phylogenetic relationships within the Ciliophora**. *Journal of Molecular Evolution*, v. 23, n. 1, p. 53-60.
- STOECK, T.; FOISSNER, W.; LYNN, D. H. (2007) **Small-Subunit rRNA Phylogenies suggest that *Epalxella antiquorum* (Penard, 1922) Corliss, 1960 (Ciliophora, Odontostomatida) is a member of the Plagyoopylea**. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 54, n. 5, p. 436-442.
- STRÜDER-KYPKE, M. C.; LYNN, D. H. (2010) **Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker**. *Systematics and Biodiversity*, v. 8, n. 1, p. 131-148.

- VĎAČNÝ, P.; BREINER, H.; YASHCHENKO, V.; DUNTHORN, M.; STOECK, T.; FOISSNER, W. (2014) **The chaos prevails: molecular phylogeny of the Haptoria (Ciliophora, Litostomatea)**. *Protist*, v. 165, n. 1, p. 93-111.
- WANG, Y.; JIANG, Y.; LIU, Y.; LI, Y.; KATZ, L. A.; GAO, F.; YAN, Y. (2020) **Comparative studies on the polymorphism and copy number variation of mtSSU rDNA in ciliates (Protista, Ciliophora): implications for phylogenetic, environmental, and ecological research**. *Microorganisms*, v. 8, n. 3, p. 316.
- WOESE, C. R. (1987) **Bacterial evolution**. *Microbiological Reviews*, v. 51, n. 2, p. 221-271.
- WRIGHT, S. (1931) **Evolution in Mendelian Populations**. *Genetics*, v. 16, n. 2, p. 97-159.
- YASINDI, A.; LYNN, D.; TAYLOR, W. (2002) **Ciliated protozoa in Lake Nakuru, a shallow alkaline-saline lake in Kenya: seasonal variation, potential production and role in the food web**. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 154, n. 2, p. 311-325.
- ZHAO, X.; PANG, S.; SHAN, T.; LIU, F. (2013) **Applications of three DNA barcodes in assorting intertidal red macroalgal flora in Qingdao, China**. *Journal of Ocean University of China*, v. 12, n. 1, p. 139-145.
- ZHONG, B.; LIU, L.; YAN, Z.; PENNY, D. (2013) **Origin of land plants using the multispecies coalescent model**. *Trends in Plant Science*, v. 18, n. 9, p. 492-495.

## RECONCILING MORPHOLOGY AND MOLECULES IN RECONSTRUCTIONS OF THE EVOLUTIONARY HISTORY OF PROTIST CILIATES

**Abstract** – Studies on molecular evolution of protist ciliates are almost exclusively based on ribosomal genes, which often recover phylogenetic trees that diverge from the traditional morphology-based systematics. Such phylogenies display low resolution, especially of the deepest nodes, failing to recover the evolutionary relationships between lineages with older divergence times. This chapter introduces the conflicts between the traditional classification and phylogenies based on molecular data in Ciliophora, and presents an approach that has been adopted to improve the knowledge of the Heterotrichea evolutionary history, using sequences of five molecular markers and morphological data in combined analyses. The multispecies coalescence concept was applied, for the first time in Ciliophora, to model the discrepancies between gene trees, caused by effects such as incomplete lineage sorting. The results revealed that: (1) the gene trees are inconsistent regarding the phylogenetic position of some heterotrichean families; (2) the multispecies coalescence tree is consistent with phylogenies based on the 18S-rDNA gene, supporting Spirostomidae as the lineage that diverged first from the common ancestor of the extant Heterotrichea. The concatenation of morphological and molecular data was effective in resolving the problem of the internal nodes of the Heterotrichea phylogeny, presenting statistically more plausible hypotheses about the evolution of this class.

**Keywords:** ciliates, unicellular eukaryotes, molecular evolution, phylogeny, protists.



# CAPÍTULO 5

## IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DA ENZIMA NUCLEOSÍDEO HIDROLASE DE *Leishmania donovani* A PARTIR DE EXTRATOS DA FLORA FLUMINENSE

**Gregório Torres Rangel**

Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais  
IPPN-UFRJ, Rio de Janeiro - RJ  
[lattes.cnpq.br/0618330188958897](http://lattes.cnpq.br/0618330188958897)

**Luzineide Wanderley Tinoco**

Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais  
IPPN-UFRJ, Rio de Janeiro - RJ  
[lattes.cnpq.br/1183078302328411](http://lattes.cnpq.br/1183078302328411)

**RESUMO** - A leishmaniose é uma doença produzida por parasitos protozoários do gênero *Leishmania sp* e é transmitida ao homem e a outras espécies de mamíferos por insetos vetores denominados flebotomíneos. Apresenta diferentes manifestações clínicas, sendo a Leishmaniose Visceral (LV) a forma mortal se não for tratada. Até hoje, nenhum tratamento foi desenvolvido para esta doença, as alternativas terapêuticas utilizadas são altamente tóxicas e diversos parasitos vem apresentando resistência ao longo dos anos. Por isso, é necessário que se desenvolvam fármacos contra alvos específicos das vias biosintéticas da *Leishmania*. Este capítulo relata um estudo realizado com 214 extratos de plantas da Mata Atlântica Fluminense para a busca de inibidores da enzima nucleosídeo hidrolase da *Leishmania donovani* (LdNH). Do extrato das folhas da *Urvillea rufescens* Cambess (Sapindaceae) foi isolada a

trisetina-4'-metoxi-flavona e do extrato das flores de *Leandra amplexicaulis* DC (Melastomataceae) foram isolados o **kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosido** e o **kaempferol 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosido**. Todos os compostos foram caracterizados estruturalmente por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM). No ensaio de inibição da LdNH a trisetina-4'-metoxi-flavona apresentou uma concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) de 1,19  $\pm$  0,26  $\mu$ M, sendo considerada um bom inibidor desta enzima. Pelo que sabemos, esta é a primeira vez que um flavonoide é descrito como inibidor de NH.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leishmaniose, Nucleosídeo Hidrolase (NH), Flavonoides.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia

Dentre as diversas doenças que afetam a saúde de bilhões de pessoas no mundo, estão as doenças tropicais negligenciadas, as quais atingem populações pobres de países em desenvolvimento, nas zonas tropicais ou subtropicais do planeta. A malária, a leishmaniose, as tripanossomíases (doença de Chagas e a Doença do sono), a

Zika e a dengue representam um pequeno grupo destas doenças, as quais são transmitidas por vetores ou animais domésticos, em lugares sem condições sanitárias mínimas, com pouco ou nenhum acesso a água potável. A disseminação destas doenças está associada com má nutrição, deficiência do sistema imunológico, falta de recursos, deslocamento de populações, desflorestamento e urbanização (ORYAN & AKBARI, 2016).

Entre essas doenças tropicais negligenciadas, a Leishmaniose merece destaque, já que ocorre em quatro continentes, é endêmica em 97 países e, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), no ano de 2018 cinco países: Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul reportaram mais de 1000 novos casos de leishmaniose visceral (LV), representando 83% dos casos mundiais. Segundo o Informe Epidemiológico das Américas No. 9 (OMS-OPS, 2020), no Brasil foram notificados em 2020 97% dos casos de LV das Américas (2.529 novos casos).

A Leishmaniose é transmitida por protozoários do gênero *Leishmania sp* e apresenta um ciclo biológico com dois estágios, uma forma intracelular arredondada a ovoide, não móvel sem flagelo aparente, chamada amastigota, com comprimento de 3–6  $\mu\text{m}$ , que se replica nas células macrófagos do mamífero, e uma forma alongada e elíptica com um flagelo estendido, denominado promastigota, de 15-30  $\mu\text{m}$  de comprimento, que prolifera extracelularmente e que mora no trato digestivo do mosquito vetor (NO, 2016).

O parasito na forma promastigota é transmitido ao homem e a outras espécies de mamíferos por insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus sp* e *Lutzomyia sp* (ZULFIQAR et al, 2017), conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui etc. Dentro do macrófago os promastigotas se transformam em amastigotas, se multiplicam nas células e invadem vários tecidos. Desta forma, a doença invade o corpo e pode apresentar diferentes manifestações clínicas: a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucocutânea (LM) e leishmaniose visceral (LV), sendo esta última mortal se não for tratada.

Segundo Burza e colaboradores (BURZA et al. 2018), as manifestações da LC e LM não são fatais, mas podem levar a morbidade substancial e estigmatização social com efeitos psicológicos. Para a LC por exemplo, no local da picada do mosquito as lesões se desenvolvem como uma pápula ao longo de semanas a meses. A pápula aumenta para um nódulo que, lentamente, forma úlceras ao longo dos meses seguintes. A LM é potencialmente fatal, pode levar à desfiguração permanente e precisa ser diagnosticada e tratada rapidamente. A LM pode ser considerada uma LC de forma crônica, que tem como principal característica a disseminação dos parasitos através da via hematogênica ou linfática até as mucosas da boca, nariz, palato, faringe e laringe. Como consequência, há a formação de lesões destrutivas que são desfigurantes pela perda parcial ou completa de tecido causada por uma forte resposta imunopatológica (TEIXEIRA et al. 2013).

A forma letal da leishmaniose, a LV, apresenta características clínicas que se manifestam de 2 a 6 meses após a infecção e incluem febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progressiva e perda de peso (NO, 2016). É causada principalmente por parasitos de *Leishmania donovani* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Leishmania infantum chagasi* no Novo Mundo (Américas). Sem tratamento, a doença costuma ser fatal em 2 anos, como resultado de infecção bacteriana secundária ou anemia grave (BURZA et al. 2018).

## 1.2 Tratamentos da Leishmaniose

Diversos tratamentos têm sido descritos para curar a doença, desde as práticas rudimentares como o emprego de calor tóxico ou curetagem nas úlceras da leishmaniose cutânea, até os tratamentos atuais com medicamentos reposicionados de outras patologias contra a leishmaniose visceral. De modo geral, todos estes tratamentos terapêuticos estão classificados em medicamentos de primeira linha, que são principalmente os compostos antimoniais pentavalentes: antimoniato de *N*-metil glucamina ou Glucantime® e o estibogluconato sódico ou Pentostan®, e os medicamentos de segunda linha, entre os quais estão a anfotericina B (incluindo a forma lipossomal), a paromomicina, a pentamidina e a miltefosina. Estes tratamentos, sejam de primeira ou segunda linha, apresentam alguns inconvenientes importantes como a baixa eficácia terapêutica, a toxicidade hepática, coronária ou renal, assim como uma progressiva resistência por parte do parasito a alguns deles ou suas combinações.

No Brasil, o Ministério de Saúde oferece tratamento gratuito para a leishmaniose visceral, disponível na rede de serviços do Sistema Único de Saúde e baseia-se na utilização de dois fármacos, a depender da indicação médica: o antimoniato de *N*-metil glucamina como medicamento de primeira linha e a anfotericina B como desoxicolato ou na forma lipossomal (incluída em maio de 2014). Porém, o uso da anfotericina B depende do cumprimento de alguns dos critérios descritos pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Por serem os dois medicamentos de escolha para o tratamento da leishmaniose no Brasil, serão descritos seus mecanismos de ação e efeitos adversos reportados na literatura.

### 1.2.1 Antimoniais pentavalentes

Os derivados pentavalentes de antimônio ( $Sb^{+5}$ ), introduzidos na década de 40, ainda são utilizados como medicamentos de primeira escolha no tratamento da leishmaniose nos países em desenvolvimento na América do Sul, Ásia e África. No entanto, sua eficácia clínica

está entre o 35% ao 95% dependendo da área geográfica, com casos importantes de falha terapêutica de até 60% (Bihar, Índia), causado por resistência ao tratamento, que segue em crescimento. (VAN et al. 2010).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. As hipóteses mais modernas sobre o mecanismo de ação destes compostos estão baseadas na interconversão reductiva do Sb(V) para o Sb(III) pelo parasito ou pela célula infectada, gerando um agente ativo, que se liga fortemente às biomoléculas contendo fragmentos com enxofre, por exemplo, formando um complexo tripanotiona-Sb(III) inibindo a atividade antioxidante da tripanotiona. Outra hipótese sugere o Sb(V) como espécie ativa, ligando-se fortemente a ribonucleotídeos tais como adenosina e guanina (NO, 2016).

Na literatura científica há diversos estudos de eficácia dos antimoniais pentavalentes, embora os efeitos adversos sejam os que tem merecido destaque nos últimos anos. Na revisão feita por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al. 2011), sobre os efeitos adversos causados pelo uso de medicamentos leishmanicidas em pacientes do Novo Mundo, foi demonstrado que, para 2900 pacientes tratados com derivados pentavalentes de antimônio, os efeitos adversos relatados foram: dor musculoesquelético, enjojo, vômito, diarreia, dor abdominal, cefaleias, anorexia, astenia, fadiga, febre, exantema, eritema e urticária. Além disso, foram observadas elevação das enzimas hepáticas e anormalidades eletrocardiográficas frequentes, como prolongamento do intervalo QTc e distúrbios na repolarização ventricular, sendo o este último, o efeito adverso o mais sério e associado com a morte.

### 1.2.2 ANFOTERICINA B

A anfotericina B, classificada quimicamente como um antibiótico poliênico, é comercializada na forma de desoxicolato (50 mg em desoxicolato de sódio) e atua nas formas amastigotas e promastigotas do parasito. Seu mecanismo de ação se dá através da ligação preferencial com ésteres (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática da leishmania. A forma lipossomal é considerada como o melhor medicamento existente contra a leishmaniose visceral e é usada nos Estados Unidos e na Europa como medicamento de primeira linha, apresentando uma eficiência de 95%. Apesar disto, não é usada em muitos países em desenvolvimento por ser um medicamento de alto custo (ORYAN & AKBARI, 2016).

O tratamento com anfotericina B é administrado por via intravenosa e a nefrotoxicidade é seu efeito adverso mais importante, já que diminui a filtração glomerular em 40%, na maioria

dos pacientes (MINISTERIO DA SAÚDE, 2006). Além disso, é altamente tóxica para as células do endotélio vascular, causando flebite. Durante a infusão poderá ocorrer cefaleia, febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômito e hipotensão (ZULFIQAR et al. 2017).

Todas estas dificuldades de segurança e eficácia, associadas as alternativas terapêuticas utilizadas na atualidade, poderiam ser evitadas se esses medicamentos reposicionados para a leishmaniose visceral tivessem sido desenvolvidos utilizando uma abordagem direta sobre a *Leishmania*, utilizar o conhecimento da bioquímica do parasito para atacar um alvo diretamente envolvido na biossíntese essencial, como por exemplo interromper a síntese da parede celular, desestabilizar os componentes da membrana celular, inibir a replicação do DNA ou restringindo a síntese de proteínas.

No entanto, observando a rápida evolução da resistência dos parasitos causadores da leishmaniose aos tratamentos utilizados, o desenvolvimento de um potencial fármaco, descoberto de um produto natural permitiria encontrar novas alternativas terapêuticas alvo-dirigidas, mais seguras para o paciente (evitando os efeitos adversos já descritos para os tratamentos atuais) e com maior possibilidade de apresentar uma alta eficiência, por agir diretamente no parasito.

Desde a descoberta e isolamento da colchicina da *Colchium autumnale* no início do século XIX, até a recente artemisinina da *Artemisia annua*, a natureza tem demonstrado sua capacidade de oferecer novas e efetivas alternativas terapêuticas para as doenças existentes. As possibilidades de descobrir uma cura contra a leishmaniose visceral a partir da flora Fluminense são infinitas.

## 1.3 Novos alvos identificados e possíveis tratamentos a partir de produtos naturais

### 1.3.1 Alvos enzimáticos essenciais da *Leishmania sp*: a Nucleosídeo Hidrolase (NH)

Entre as vias bioquímicas mais estudadas dos tripanossomatídeos estão via da glicólise, a via das purinas, a via das proteases, a via do MAP quinase e a biossíntese de esteróis ou de folato entre outras, sendo as duas primeiras as que possuem o maior número de enzimas alvo identificadas.

No sequenciamento do genoma da *Leishmania major*, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* se evidencia a existência de alvos celulares potenciais na via da glicólise, enzimas como a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a Triosefosfato isomerase, Piruvato quinase, Fructose-1,6-bisfosfato aldolase ou Glucose-6-fosfato isomerase. Estas são essenciais

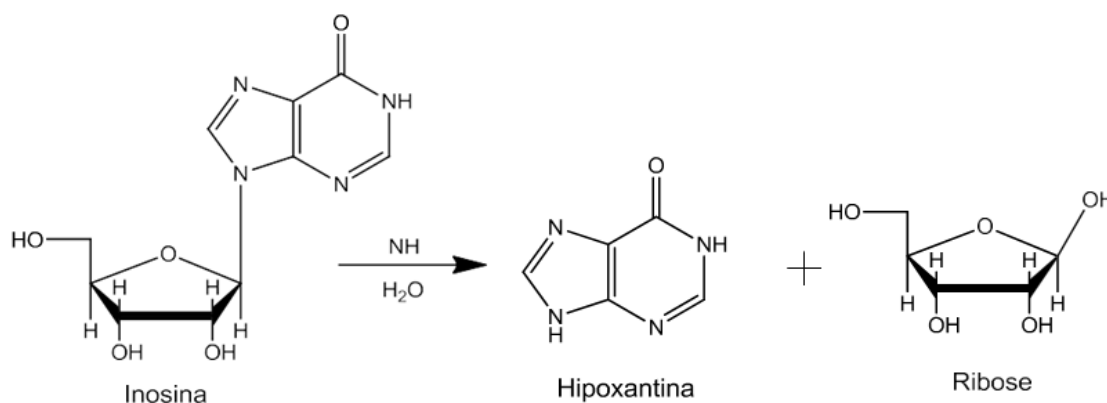
no metabolismo energético dos tripanossomatídeos já que eles usam a glicólise como a única fonte de geração de ATP e dependem exclusivamente das fontes de carbono disponíveis no hospedeiro para a biossíntese de suas fontes energéticas (CHAWLA & MADHUBALA, 2010).

Na via das purinas, merecem destaque a Hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRF), a Adenina fosforibosil transferase (APRT), a Adenosina quinase e a Nucleosídeo hidrolase, as quais são enzimas específicas amplamente estudadas e que podem ser consideradas alvos para o planejamento de novos leishmanicidas, já que mesmo como acontece com a via da glicólise na maioria dos tripanossomatídeos, estes organismos dependem das bases nitrogenadas do hospedeiro (CHAWLA & MADHUBALA, 2010; NAGLE et al. 2014 e RAJALAKSHMI & YI-PING, 2015).

A nucleosídeo hidrolase (NH) por exemplo, é uma enzima alvo da família tripanossomatídeos (CUI et al. 2001), e que pode ser considerada um componente importante para a sobrevivência dos parasitos da espécie *Leishmania sp*, já que eles dependem exclusivamente das purinas e pirimidinas obtidas do hospedeiro, porque não tem mecanismo para biossíntese *de novo* para a sua produção. Nesse sentido, considerando a importância para o parasito e o fato de não haver homólogos em mamíferos a NH é considerada um alvo promissor para a busca de potenciais medicamentos quimioterápicos contra doenças produzidas por parasitos da família Trypanosomastidae (VERSÉES et al. 2002).

A enzima NH permite ao parasito obter as nucleobases essenciais a partir da clivagem de nucleosídeos, conforme mostrado na **Figura 1**, no qual o substrato inosina (podendo ser uridina, citidina, adenosina ou guanina), é hidrolisado em um açúcar (ribose) e uma base nitrogenada (hipoxantina), a qual será usada em suas funções de biossíntese de DNA ou RNA.

**Figura 1** – Reação de conversão de nucleosídeo catalisada pela NH, exemplificada pelo substrato inosina com a formação dos produtos hipoxantina e ribose

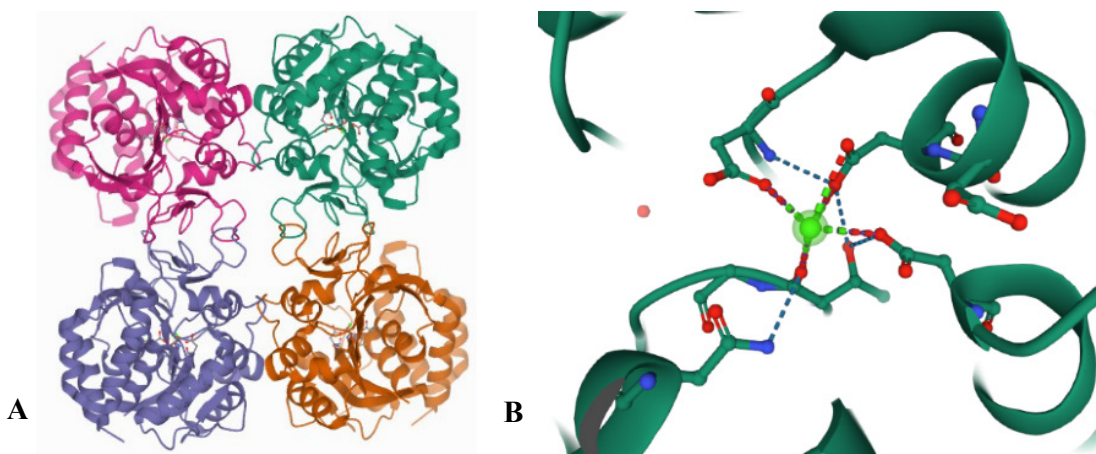


A enzima NH, ou nucleosídeo N-ribohidrolase pertencentes ao gênero *Leishmania*,



são parte de uma superfamília de metalo-proteínas relacionadas estruturalmente, com uma topologia original de cadeias  $\beta$  (FRANÇA et al. 2008). Todas as NH estudadas estão na forma de homodímeros ou homotetrâmeros (**Figura 2**) e apresentam grande similaridade na sequência de aminoácidos do sítio ativo, indicando que elas estão intimamente relacionadas estruturalmente e no mecanismo catalítico (SHI et al. 1999).

**Figura 2** – Visão em 3D das subunidades de NH de *Leishmania major*. A) Interface tetramérica com a localização do sítio catalítico pela presença do  $\text{Ca}^{+2}$  B) Unidade monomérica com destaque da presença do  $\text{Ca}^{2+}$  (em verde)



Fonte: *Protein Data Bank 1EZR*

### 1.3.2 Produtos naturais como fontes de novos leishmanicidas

No estudo de produtos naturais, inúmeras plantas e substâncias isoladas com atividade antileishmaniana já foram descritas, sendo uma grande porcentagem identificadas a partir de triagens com ensaios *in vitro* contra promastigotas ou amastigotas intracelulares de várias espécies de *Leishmania* (NAGLE et al. 2014). Aqui somente serão apresentados os resultados de compostos em triagens com avaliações realizadas com *L. donovani*.

Pesquisas aprofundadas têm permitido identificar metabolitos secundários com atividade leishmanicida a partir de extratos brutos. Segundo a literatura, os principais grupos de compostos que tem apresentado esta atividade biológica contra promastigotas da *L. donovani*, são os compostos fenólicos (os flavonoides, as chalconas, as cumarinas, as lignanas e os taninos), seguido pelos alcaloides, terpenoides, e os compostos quinônicos.

Na revisão feita por Tajuddeen e colaboradores (TAJUDDEEN et al. 2017), foi avaliado o potencial quimioterapêutico de 278 chalconas sintéticas e 34 obtidas de plantas contra a



leishmaniose, em artigos apresentados entre os anos 1996 e 2016. As chalconas derivadas de plantas pertenciam principalmente às famílias Fabaceae e Piperaceae, tendo como exemplos a licochalcona A, um composto isolado de *Glycyrriza glabra* (Fabaceae) que inibiu fortemente o crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. major* e *L. donovani* ( $CI_{50} = 24 \mu\text{g/mL}$  para ambas as espécies).

Diversas pesquisas têm apresentado os flavonoides como fortes inibidores da *L. donovani*. Salem e Webovetz (SALEM & WERBOVETZ, 2006), por exemplo, testaram a luteolina e a quercetina em ensaios *in vitro* contra promastigotas de *L. donovani*, obtendo valores de  $CI_{50}$  de  $12,5 \mu\text{g/mL}$  e  $45,5 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Mostafa e colaboradores (MOSTAFA et al. 2014) isolaram da *Dodonea viscosa* Linn., (Sapindaceae) dois novos diterpenos clerodanos, um derivado mio-inositol e oito compostos de natureza flavonoide. A análise *in vitro* de todos os compostos isolados contra promastigotas de *L. donovani* mostrou uma atividade moderada para dois flavonóis, o 5-hidroxi, 3,6,7,4'-tetrametoxi flavona ( $CI_{50} = 16,6 \mu\text{g/mL}$ ) e a 5,7-dihidroxi-3'-(4-hidroxi-3-metil butil)-3,6,4'-trimetoxi flavona ( $CI_{50} = 19,06 \mu\text{g/mL}$ ).

No Brasil, Muzitano e colaboradores (MUZITANO et al. 2006) compararam a atividade leishmanicida de flavonoides como a quercitrina, a quercetina e a afzelina assim como de flavonoides glicosilados obtidos da *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae), contra amastigotas de *Leishmania donovani*, *in vitro*. Eles conseguiram identificar a importância da quercetina ( $CI_{50} \sim 8 \mu\text{g/mL}$ ) presente no flavonoide quercitrina (quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosido ( $CI_{50} \sim 45 \mu\text{g/mL}$ ), o qual exibiu a mais alta resposta biológica da avaliação.

Junto com o grupo dos flavonoides, os alcaloides são os compostos que apresentam o maior número de citações na literatura sobre metabólitos com atividade leishmanicida. Kam e colaboradores (KAM et al. 1999) identificaram os metabólitos responsáveis pela atividade antileishmania do extrato etanólico das folhas de *Kopsia griffithii* (Apocinaceae). Eles isolaram 19 alcaloides de natureza indólica. Porém, nos ensaios *in vitro* contra promastigotas de *L. donovani*, somente três apresentaram atividade, a harmana ( $CI_{50} = 34,29 \mu\text{M}$ ), a pleiocarpina ( $CI_{50} = 63,05 \mu\text{M}$ ), e a buchtienina, sendo este último o mais ativo com  $CI_{50} < 3,5 \mu\text{M}$ .

Diversos alcaloides de natureza isoquinolínica da família Annonaceae apresentaram atividade contra *L. major*, *L. donovani* e *L. amazonensis* (MISHRA et al., 2009). A berberina foi muito ativa ( $CI_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$ ) contra *L. major* em macrófagos peritoneais de rato, a isoguattoregida isolada das cascas de *Guateria foliosa*, exibiu moderada atividade *in vitro* ( $CI_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$ ) contra promastigotas de *L. donovani* e *L. amazonensis*. A anonanina isolada da *Annona spinencens* não apresentou boa atividade contra os promastigotas de *L. braziliensis* e *L. donovani*. Contudo, a unonopsina, um alcaloide dimérico aporfínico semelhante a anonanina, isolado de *Unonopsis buchtienii* Fries, exibiu boa atividade contra promastigotas

de *L. donovani* ( $CI_{100} = 25 \mu\text{g/mL}$ ).

Seis novos alcaloides isolados de uma espécie congoleza de *Ancistrocladus* sp foram avaliados por Bringmann e colaboradores (BRINGMANN et al. 2008) em ensaios *in vitro* contra promastigotas de *L. donovani*. Estes novos metabólitos apresentaram acoplamentos tipo C-C, até então não reportadas na literatura, e os dois mais ativos foram identificados como 5'-*O*-demetilhamatina ( $CI_{50} = 4,4 \mu\text{g/mL}$ ) e 5-*epi*-6-*O*-metilancistrobertsonina ( $CI_{50} = 1,6 \mu\text{g/mL}$ ).

Entre os compostos de natureza terpenoide, Tan e colaboradores (TAN et al. 2002) reportaram o isolamento de dois novos diterpenos: o 7-hidróxi-12-metóxi-20-*nor*-abieta-1,5(10),7,9,12-pentaen-6,14- dienona e o abieta-8-12-dien-11,14-diona (12-deoxi-roileanona). Estes metabólitos apresentaram moderada atividade leishmanicida *in vitro* contra amastigotas de *L. major* ( $CI_{50}$  de 290 e 180 nM, respectivamente) e *L. donovani* (valores de  $CI_{50}$  de 170 e 120nM respectivamente) e foram identificados mediante o fracionamento bioguiado do extrato em acetona das raízes de *Salvia cilicica* (Lamiaceae), uma planta usada na medicina tradicional na Turquia para o tratamento de várias doenças, incluindo infecções.

A betulina, um triterpeno amplamente encontrado em plantas, foi isolado das cascas de uma espécie de *Betula* sp e avaliado como inibidor do crescimento de promastigotas ( $CI_{50} = 2,6 \mu\text{M}$ ) e amastigotas ( $CI_{50} = 4,1 \mu\text{M}$ ) de *L. donovani*. Este composto serviu de material de partida para a semi-síntese de vários derivados heterocíclicos de betulina, entre os quais o ácido betulínico foi o mais potente do grupo com um valor de  $CI_{50} = 14,6 \mu\text{M}$  no ensaio contra amastigotas axênicas de *L. donovani* (ALAKURTTI et al. 2010).

Finalmente, entre as quinonas que merecem destaque estão a bis-naftoquinôna diospirina isolada das cascas de *Diospyros montana* (Ebenaceae) que mostrou um efeito inibitório contra promastigotas de *L. donovani* ( $CI_{50}$  de  $1,9 \mu\text{M}$ ) mediante a geração de radicais livres e inibição da enzima topoisomerase I. Porém, não apresentou resultados significativos contra amastigotas intracelulares da mesma espécie de parasito (SALEM & WERBOVETZ, 2006; SEM & CHATTERJEE, 2011). A plumbagina, o maior componente das espécies *Plumbago* sp tem atividade antileishmania contra promastigotas de *L. donovani* ( $CI_{50} = 0,21 \mu\text{M}$ ). Este metabólito pode ter um mecanismo de ação completamente diferente da diospirina, já que foi evidenciada a clivagem da topoisomerase II em ensaios *in vivo* em células de mamíferos (SINGH et al., 2014).

Todos estes estudos apresentam uma ampla variedade de metabólitos secundários que servem como marcadores quimiotaxonômicos em espécies de uma mesma família, fato que dá maior suporte a atividade biológica identificada nas triagens de metabólitos ativos. Porém, as avaliações apresentadas dos extratos ou compostos isolados e encontrados na literatura,

foram o resultado de avaliações *in vitro* contra amastigotas ou promastigotas de *L. donovani* e nenhum deles relata ensaios *in vitro* de compostos de origem natural testados contra a enzima nucleosídeo hidrolase da *Leishmania donovani* (LdNH).

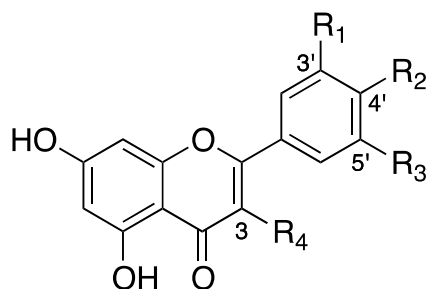
## 2 RESULTADOS

### 2.1 Identificação de inibidores da LdNH

No estudo realizado por Nirma e colaboradores (NIRMA et al. 2019) e Casanova e colaboradores (CASANOVA et al. 2020) foi realizada uma triagem com 214 extratos brutos de plantas da Mata Atlântica Fluminense para avaliar sua capacidade inibitória sobre a enzima LdNH. Vinte e oito extratos com capacidade inibitória igual ou superior a 50% foram identificados. Devido à ausência de estudos fitoquímicos, foram selecionados para os estudos preliminares os extratos das folhas de *Ormosia arborea* entre os extratos mais ativos, e do qual foram identificadas duas novas proantocianidinas tipo A mediante uma moderna estratégia quimiométrica baseada em análise de dados de <sup>1</sup>H RMN, e dos extratos das folhas da *Urvillea rufescens* Cambess e das flores de *L. amplexicaulis*, três flavonoides ativos.

Mediante fracionamento bioguiado e utilizando diversas técnicas cromatográficas, nosso grupo de pesquisa isolou o composto 1: **trictina-4'-metoxi-flavona (Figura 3)** do extrato das folhas da *Urvillea rufescens* Cambess (Sapindaceae), que teve sua estrutura confirmada a partir dos dados de RMN 1D e 2D e por espectrometria de massas. Esta flavona foi isolada primeiro de *Passiflora palmeri* Rose (Passifloraceae) e depois de *Heliotropium pycnophyllum* (Boraginaceae).

Neste mesmo estudo, a partir do extrato de flores de *L. amplexicaulis*, foram isoladas duas substâncias (compostos 2 e 3) que foram identificadas por RMN 1D e 2D e espectrometria de massas. Diferentemente do composto 1, ambas as moléculas têm uma estrutura flavonóide aglicona substituída por um ou dois açúcares (**Figura 3**). O Composto 2 tem um esqueleto de kaempferol com uma unidade ramnopiranosil, sugerida por um duplete de metila característico em  $\delta$  0,92 (J = 6 Hz). Foi identificado por comparação com dados da literatura como **kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo**. O Composto 3 também possui um esqueleto de kaempferol com uma ramnose e uma xilopiranosose ligada em C-3. Foi identificado como **kaempferol 3-O-b-D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo** de acordo com dados da literatura. Este flavonol diglicosilado foi descrito pela primeira vez nas folhas de *Moghania faginea* (Fabaceae), depois na planta medicinal *Kalanchoe daigremontiana* e, subsequentemente, de *Pourthiaea villosa*, juntamente com o composto 2. Os 3-O-glicosídeos do kaempferol são o grupo mais comum de flavonóides.

**Figura 3** – Estrutura molecular dos flavonoides isolados 1-3

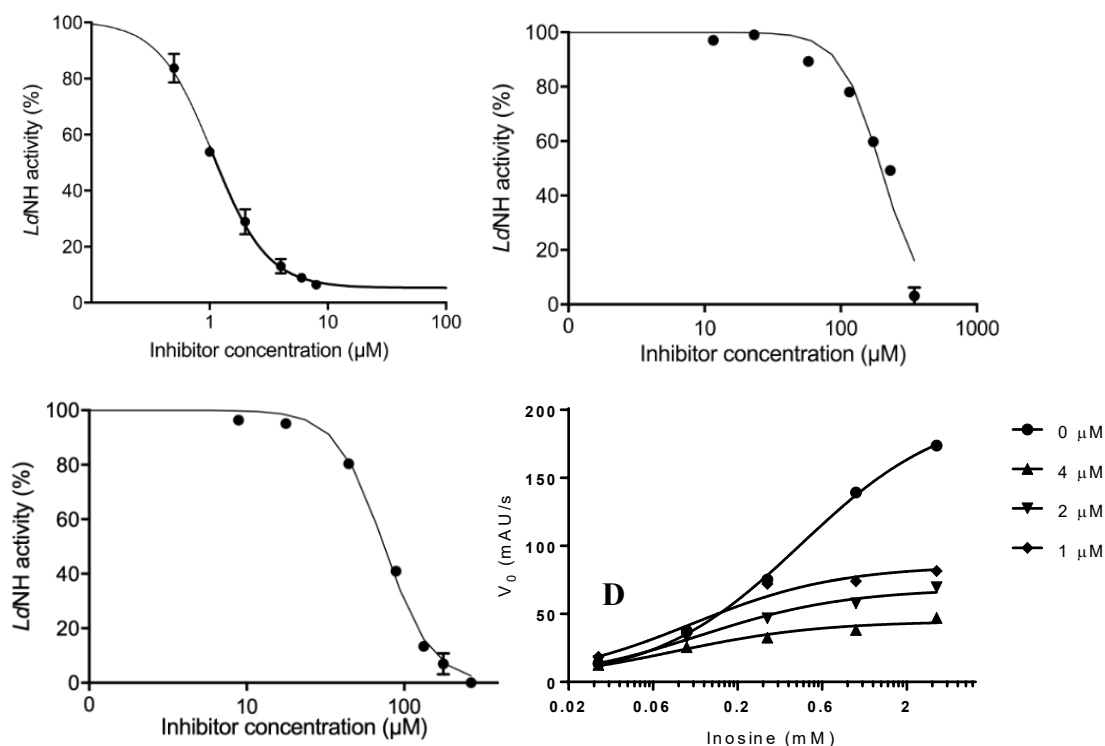
Flavonoides	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H
2	H	OH	H	O-α-L-rhamnopyranosa
3	H	OH	H	O-β-D-xylopyranosyl (1→2)-α-L-rhamnopyranosa

Fonte: Nirma et al. 2019

## 2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA (CI<sub>50</sub>) DOS COMPOSTOS ISOLADOS SOBRE A LDNH E AVALIAÇÃO IN SILICO

A fim de determinar a potência inibitória dos compostos isolados, foram realizadas avaliações para da CI<sub>50</sub> com as condições descritas por Nirma e colaboradores (NIRMA et al. 2019). Os resultados são representados na **Figura 4**. Para o composto 1, o mais potente do ensaio com CI<sub>50</sub> = 1,19 ± 0,26 μM, foram realizadas curvas de efeito de concentração para a atividade enzimática de LdNH com diferentes concentrações de inosina (0,03, 0,10, 0,30, 1,00 e 3,00 mM). O experimento foi realizado na ausência (controle C) ou na presença de concentrações crescentes de composto 1.

**Figura 4** – Determinação da  $CI_{50}$  do composto 1 (A), composto 2 (B), composto 3 (C) e curvas do efeito-concentração do composto 1 (D) com diferentes concentrações de inosina



Adicionalmente, para identificar o modo de interação do flavonoide 1 com a *LdNH*, foi realizada uma avaliação *in silico* mediante docking molecular a partir do modelo de homologia de *LdNH* previamente desenvolvido por Alves e colaboradores (ALVES et al. 2016). O composto 1 foi desenhado usando Spartan'14 com os modos de ligação ligante-alvo investigados usando o servidor da web SwissDock. A análise das soluções de docking molecular foi realizada utilizando os programas Chimera 1.10.2 e Pymol 1.5.0.5.

Os dados obtidos do docking molecular podem ser utilizados posteriormente para a otimização estrutural deste inibidor no desenvolvimento de um protótipo com ação inibitória do *LdNH* com maior potência e ação leishmanicida. Dado o mecanismo de inibição não competitivo do flavonoide 1, o modelo contendo inosina foi usado para realizar os ensaios de docking de forma exploratória, sem definir o espaço de docking. Para isso, o modelo *LdNH* contendo o complexo com inosina e flavonoide 1, foi submetido ao servidor SwissDock para identificação das regiões de docking.

Conforme observado por Nirma e colaboradores (NIRMA et al. 2019), as três posturas de acoplamento de energia mais baixa da interação ligante-proteína estão localizadas na mesma bolsa alostérica. Essa bolsa alostérica está localizada próximo ao sítio catalítico, que é representado pela presença da inosina (laranja) e do íon cálcio (esfera verde). A análise do

complexo com a energia intermolecular mais baixa ( $6,83 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) mostra que o flavonoide 1 interage com os resíduos de Ser-79, His-82, Glu-232 e Asn-77 da *LdNH*.

Com base nesses resultados, nosso grupo está trabalhando agora para otimizar a estrutura do flavonoide 1 com o objetivo de desenvolver um composto com maior número de pontos de interação com *LdNH* e avaliar se as mudanças estruturais promovem um aumento na potência do efeito leishmanicida.

### 3. CONCLUSÕES

Dos 214 extratos de plantas da Mata Atlântica Fluminense testados, 13% (28 extratos) apresentaram atividade inibitória igual ou superior a 50% contra a enzima nucleosídeo hidrolase de *Leishmania donovani* (*LdNH*), demonstrando o grande potencial da flora do Estado de Rio de Janeiro para produzir compostos com atividade biológica. Além disso, os resultados obtidos desta pesquisa permitem concluir que a metodologia usada para a triagem de extratos vegetais pela inibição da *LdNH*, pode ser utilizada como uma ferramenta confiável no fracionamento biodirigido em combinação com diferentes técnicas cromatográficas.

A combinação de diferentes técnicas cromatográficas, com a espectrometria de massas, a RMN e os ensaios de inibição enzimática, permitiu identificar proantocianidinas, flavonoides glicosilados e uma aglicona como inibidores da enzima nucleosídeo hidrolase (*LdNH*) da *Leishmania donovani*. Estes foram os primeiros estudos demonstrando que os flavonoides como inibidores para esta enzima.

### REFERÊNCIAS

- ALAKURTTI, S.; HEISKA, T.; KIRIAZIS, A.; SACERDOTI-SIERRA, N.; JAFFE, C. L.; YLI-KAUHALUOMA, J. **Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 4, p. 1573–1582, 2010.
- ALVES, M. A.; NIRMA, C.; MOREIRA, M. M.; SOARES, R. O.; PASCUTTI, P. G.; NOËL, F.; COSTA, P. R. R.; SANT'ANNA, C. M. R.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; TINOCO, L. W. **Non-competitive inhibitor of nucleoside hydrolase from: *Leishmania donovani* identified by fragment-based drug discovery**. *RSC Advances*, v. 6, n. 90, p. 87738–87744, 2016
- BURZA, S.; CROFT S.L.; BOELAERT, M. **Leishmaniasis**. *Lancet* 2018; 392: 951–970
- BRINGMANN, G.; SPUZIAK, J.; FABER, J. H.; GULDER, T.; KAJAHN, I.; DREYER, M.; HEUBL, G.; BRUN, R.; MUDOGO, V. **Six naphthylisoquinoline alkaloids and a related benzopyranone from a Congolese *Ancistrocladus* species related to *Ancistrocladus congolensis***. *Phytochemistry*, v. 69, n. 4, p. 1065–1075, 2008.
- CASANOVA L.M.; RODRIGUEZ, L.M.; DE AGULAR, P.F.; TINOCO, L.W. **An NMR-Based Chemometric Strategy to Identify *Leishmania donovani* Nucleoside Hydrolase Inhibitors from the Brazilian Tree *Ormosia arborea***. *J. Nat. Prod.* 2020, 83, 243–254
- CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. **Drug targets in *Leishmania***. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 34, n. 1, p. 1–13, 2010.

- CUI, L.; RAJASEKARIAH, G. R.; MARTIN, S. K. **A nonspecific nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*: Implications for purine salvage by the parasite.** Gene, 2001.
- FRANÇA, T. C. C.; ROCHA, M. do R. M.; REBOREDO, B. M.; RENNÓ, M. N.; TINOCO, L. W.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. **Design of inhibitors for nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani* using molecular dynamics studies.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 19, n. 1, p. 64–73, 2008.
- KAM, T.-S.; SIM, K.-M.; KOYANO, T.; KOMIYAMA, K. **Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*.** Phytochemistry, v. 50, n. 1, p. 75–79, 1999.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.** 1a. ed. Brasília DF. 2006. 120p.
- MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. **Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis.** Fitoterapia, v. 80, n. 2, p. 81–90, 2009.
- MOSTAFA, A. E.; EL-HELA, A. A.; MOHAMMAD, A.-E. I.; JACOB, M.; CUTLER, S. J.; ROSS, S. A. **New secondary metabolites from *Dodonaea viscosa*.** Phytochemistry Letters, v. 8, p. 10–15, 2014.
- MUZITANO, M. F.; TINOCO, L. W.; GUETTE, C.; KAISER, C. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. **The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*.** Phytochemistry, v. 67, n. 18, p. 2071–2077, 2006.
- NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. **Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis.** Chemical Reviews, v. 114, n. 22, p. 11305–11347, 2014.
- NIRMA, CH.; TORRES, G.; ALVES, M.; CASANOVA, L.M.; MONTEIRO, M.; MONTEIRO, L.; HAMERSKI, L.; TINOCO, L.W. **New *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase inhibitors from Brazilian flora.** RSC Adv., 2019, 9, 18663
- NO, J. H. **Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries.** Acta Tropica, v. 155, p. 113–123, 2016.
- OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M.; PASSOS, S. L.; OLIVEIRA, R. V.; MARZOCHI, M. C.; ANDRADE, C. A. **Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World.** Acta Tropica, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.
- OMS-OPS. **Informe Epidemiológico das Américas.** Informe Leishmanioses No. 9, Dez 2020
- ORYAN, A.; AKBARI, M. **Worldwide risk factors in leishmaniasis.** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.
- RAJASEKARAN, R.; PHOEBE CHEN, Y.-P. **Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs.** Drug Discovery Today, v. 20, p. 958–968, 2015.
- SALEM, M. M.; WERBOVETZ, K. A. **Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against Leishmaniasis and Trypanosomiasis.** Current Medicinal Chemistry, v. 13, p. 2571–2598, 2006.
- SEN, R.; CHATTERJEE, M. **Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis.** Phytomedicine, v. 18, n. 12, p. 1056–1069, 2011.
- SHI, W.; SCHRAMM, V. L.; ALMO, S. C. **Nucleoside Hydrolase from *Leishmania major*.** Journal of Biological Chemistry, v. 274, n. 30, p. 21114–21120, 1999.
- SINGH, N.; MISHRA, B. B.; BAJPAI, S.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. **Natural product-based leads to fight against leishmaniasis.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 22, n. 1, p. 18–45, 2014.
- TAJUDDEEN, N.; ISAH, M. B.; SULEIMAN, M. A.; VAN HEERDEN, F. R.; IBRAHIM, M. A. **The chemotherapeutic potential of chalcones against leishmaniasis: a review.** International Journal of Antimicrobial Agents, 2017.
- TAN, N.; KALOGA, M.; RADTKE, O. A.; KIDERLEN, A. F.; ÖKSÜZ, S.; ULUBELEN, A.; KOLODZIEJ, H. **Abietane diterpenoids and triterpenic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities.** Phytochemistry, v. 61, n. 8, p. 881–884, 2002.
- TEIXEIRA D.E., BENCHIMOL, M.; RODRIGUEZ, J.C.; CREPALDI, P.H.; PAOLUCI, P.F.; DE SOUZA, W. **Atlas didático:**



**Ciclo de vida da Leishmania.** 1a. ed. Rio de Janeiro. Fundacao CECIERJ. 2013. 64p.

VAN GRIENSVEN, J.; BALASEGARAM, M.; MEHEUS, F.; ALVAR, J.; LYNEN, L.; BOELAERT, M. **Combination therapy for visceral leishmaniasis.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 10, n. 3, p. 184–194, 2010.

VERSÉES, W.; DECANNIERE, K.; VAN HOLSBEKE, E.; DEVROEDE, N.; STEYAERT, J. **Enzyme-substrate interactions in the purine-specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 18, p. 15938–15946, 2002.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. **Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development.** *Drug Discovery Today*, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017.

## NEW *Leishmania donovani* NUCLEOSIDE HYDROLASE INHIBITORS FROM BRAZILIAN FLORA

**Abstract** - Leishmaniasis is a disease produced by protozoan parasites of the genus *Leishmania* sp and is transmitted to man and other mammal species by insect vectors called sandflies. It presents different clinical manifestations, with Visceral Leishmaniasis (VL) being the deadly form if left untreated. To date, no treatment has been developed for this disease, the therapeutic alternatives used are highly toxic and several parasites have been showing resistance over the years. Therefore, it is necessary to develop drugs against specific targets of the biosynthetic pathways of Leishmania. This chapter reports a study carried out with 214 plant extracts from the Fluminense Atlantic Forest to search for inhibitors of the enzyme nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani* (LdNH). From the extract of the leaves of *Urvillea rufescens* Cambess (Sapindaceae) tricetin-4'-methoxy-flavone was isolated and from the extract of the flowers of *Leandra amplexicaulis* DC (Melastomataceae) kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside and kaempferol were isolated 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside. All compounds were structurally characterized by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectrometry (MS). In the LdNH inhibition assay, tricetin-4'-methoxy-flavone presented a mean inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of  $1.19 \pm 0.26 \mu\text{M}$ , being considered a good inhibitor of this enzyme. As far as we know, this is the first time a flavonoid has been described as an LdNH inhibitor.

**Keywords:** Leishmaniasis, Nucleoside Hydrolase (NH), Flavonoids

# CAPÍTULO 6

## TRIAGEM DE ALTO DESEMPENHO UTILIZANDO ENSAIO DE MENSURAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR APLICADA À DESCOBERTA DE ANTAGONISTAS PARA RECEPTORES PURINÉRGICOS P2Y2 E P2Y4

**Natiele Carla da Silva Ferreira**

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ  
<http://lattes.cnpq.br/4568173947099233>

**Rômulo José Soares Bezerra**

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ  
<http://lattes.cnpq.br/8172011342962422>

**Luiz Anastacio Alves**

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ  
<http://lattes.cnpq.br/8572675732158244>

**RESUMO** – Os receptores P2Y2 e P2Y4 são receptores purinérgicos ativados fisiologicamente pelo UTP e pelo ATP. Eles são expressos em diferentes tecidos em humanos, onde promovem uma série de efeitos fisiológicos, incluindo a mobilização de cálcio intracelular. Além disso, a inibição desses receptores pode gerar efeitos antiinflamatórios, analgésicos, antimetastáticos e laxativos, que demonstram o seu potencial terapêutico. Todavia, a escassez de moléculas antagonistas dificulta a implementação de fármacos com ação sobre esses receptores

na terapia, o que estimula a busca por novas moléculas que apresentem essa atividade. Em vista disso, o objetivo desse trabalho foi padronizar uma metodologia de triagem de alto desempenho capaz de identificar novos antagonistas dos receptores P2Y2 e P2Y4. Essa metodologia é baseada na mensuração dos níveis de cálcio intracelular, cujo protocolo foi testado e otimizado a fim de fornecer as condições adequadas para a realização dos ensaios. Além disso, foram testadas concentrações crescentes de ionomicina, ATP e UTP no intuito de avaliarmos a sensibilidade do equipamento. Com isso, obtivemos os valores de  $EC_{50}$  de 103 nM, 10  $\mu$ M e 1,021  $\mu$ M, respectivamente. Por fim, foi conduzida uma mini-campanha de triagem de alto desempenho utilizando amostras de extratos vegetais. Esses experimentos revelaram que o extrato de galhos de *Joannesia princeps* Vell. foi capaz de inibir a mobilização de cálcio intracelular de forma concentração-dependente, apresentando um  $IC_{50}$  de 32,32  $\mu$ g/mL. Portanto, a metodologia padronizada foi capaz de identificar novos antagonistas para os receptores P2Y2 e P2Y4 de origem natural.

**Palavras-chave:** triagem, cálcio, receptores P2Y, UTP.

### 1 INTRODUÇÃO

Os receptores purinérgicos são

receptores expressos na membrana plasmática de diversos tipos celulares em mamíferos (Kaczmarek-Hájek *et al.*, 2012; Ralevic e Burnstock, 1998). Esses receptores são ativados por purinas e pirimidinas extracelulares e participam do desenvolvimento de uma série de respostas fisiológicas, incluindo a neurotransmissão, a contração do músculo liso, a resposta imune, a inflamação e a dor (Ralevic e Burnstock, 1998). Em humanos, esses receptores estão organizados em duas famílias: P1, cujos receptores são ativados por adenosina, e P2, cujos receptores são ativados por diferentes nucleotídeos. Os receptores P2 são ainda subdivididos em duas classes: P2X, que compreende os receptores ionotrópicos, e P2Y, que compreende os receptores acoplados à proteína G (Coddou *et al.*, 2011; Ralevic e Burnstock, 1998).

Dentre os receptores P2Y, os subtipos P2Y2 e P2Y4 são ativados pela molécula de uridina trifosfato (UTP). Esses receptores compartilham a mesma estrutura básica, isto é, possuem sete domínios transmembrana (TM1-7), e os domínios N-terminal extracelular e C-terminal intracelular (Ralevic e Burnstock, 1998). Além disso, ambos receptores são acoplados à proteína G quiescente (Gq) que ativa a proteína fosfolipase C (PLC), que por sua vez, promove a clivagem do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). Esse último ativa o receptor de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) expresso na membrana do retículo endoplasmático, viabilizando um influxo de cálcio para o citosol (Rang *et al.*, 2011).

O P2Y2 é um receptor fisiologicamente ativado tanto pelo UTP quanto pela adenosina trifosfato (ATP). Ele está expresso em células do pulmão, coração, baço e rins, além de células do sistema imune (von Kügelgen, 2006; von Kügelgen e Hoffmann, 2016). A inibição do P2Y2 parece ser útil no tratamento de doenças inflamatórias, dor e câncer, uma vez que a ativação desse receptor estimula a produção de mediadores inflamatórios e a migração de células inflamatórias para o sítio de lesão (Eun, Park, *et al.*, 2014; Eun, Seo, *et al.*, 2014), além de promover a proliferação, a migração, a invasão e a metástase de algumas linhagens tumorais (Chadet *et al.*, 2014; Choi, Ji e Lee, 2013; Jin *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2014). Dessa forma, os antagonistas do receptor P2Y2 poderiam atuar como potenciais agentes antiinflamatórios, analgésicos e antitumorais. Contudo, o único antagonista do receptor P2Y2 disponível, o AR-C118925, possui algumas limitações farmacológicas que não favorece o seu uso em humanos (Rafehi e Müller, 2018).

O receptor P2Y4 expresso em humanos é ativado fisiologicamente pelo UTP. Em ratos e camundongos, ele pode ser ativado tanto pelo UTP quanto pelo ATP (von Kügelgen, 2006). O P2Y4 está expresso em células do intestino, cérebro, pulmão, coração, próstata, pele e baço (Rafehi e Müller, 2018). No intestino, a ativação desse receptor parece estar envolvida na constipação, e dessa forma, um antagonista do receptor P2Y4 poderia atuar como potencial laxante (Zizzo *et al.*, 2012). Todavia, a caracterização dos efeitos fisiológicos do P2Y4 ainda

constitui um grande desafio devido às semelhanças estruturais e farmacológicas que ele compartilha com o receptor P2Y2 (Rafehi e Müller, 2018).

A descoberta de novos antagonistas para os receptores P2Y2 e P2Y4 pode promover grandes avanços no campo de Farmacologia envolvendo esses receptores. Nesse sentido, estratégias de triagem de alto desempenho podem colaborar significativamente para essa descoberta ao apontarem potenciais antagonistas. Assim, uma estratégia de metodologia de triagem que pode ser aplicada nesse tipo de pesquisa diz respeito à mensuração dos níveis de cálcio intracelular, uma vez que a ativação desses receptores induz a mobilização desse íon.

Atualmente, existem diversas ferramentas para a mensuração do cálcio intracelular. Dentre elas, estão as populares moléculas Fura-2, Fluo-3 e Fluo-4, as quais emitem fluorescência ao se ligarem ao cálcio (Bruton, Cheng e Westerblad, 2012). Esses indicadores de cálcio são bastante versáteis e podem ser empregados em experimentos que utilizam microscopia e citometria, bem como leitor de placas com fluorescência (fluorímetro), sendo esse último o instrumento mais compatível com a triagem de alto desempenho (Sullivan, Tucker e Dale, 1999).

Tendo isso em vista, o objetivo desse trabalho foi padronizar uma metodologia de triagem de alto desempenho utilizando o ensaio de mensuração de cálcio intracelular para a detecção de potenciais antagonistas para os receptores P2Y2 e P2Y4.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cultura de células

As células J774.G8 utilizadas nos ensaios correspondem a uma linhagem imortalizada de macrófagos murinos que expressa alguns subtipos de receptores P2 (Coutinho-Silva *et al.*, 2005). Para a condução dos experimentos, essas células foram tripsinizadas e plaqueadas em placa preta de fundo claro (Corning, EUA) a uma concentração de  $4 \times 10^5$  células por poço, o qual continha 200  $\mu\text{L}$  de meio DMEM (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA). As placas foram mantidas por 24h em estufa a 37°C e em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

### 2.2 Carregamento das células com o indicador de cálcio

O meio de cultura em que as células foram plaqueadas foi substituído por 100  $\mu\text{L}$  de PBS Dulbecco (DPBS) (136 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,46 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,9 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5,55 mM glicose, 2,5 mM probenecida (Sigma, EUA) – pH 7.4)

contendo 2  $\mu\text{M}$  de Fluo-4AM (Molecular Probes, EUA). Em alguns experimentos durante a padronização do protocolo foram utilizadas concentrações crescentes do Fluo-4AM ou 2  $\mu\text{M}$  de Fluo-3AM. Em seguida, as células foram incubadas em estufa a 37° C durante 60 minutos e posteriormente, os poços receberam três lavagens consecutivas com 200  $\mu\text{L}$  de DPBS, sendo que após a última lavagem, foi adicionada a cada poço a quantidade de 150  $\mu\text{L}$  dessa solução.

### 2.3 Mensuração dos níveis de cálcio no leitor de placas

Os níveis de cálcio intracelular das células carregadas com o indicador de cálcio foram mensurados no leitor de placas FlexStation III (Molecular Devices, EUA). Os níveis de cálcio intracelular foram avaliados em tempo real durante 90 segundos, sendo que o equipamento realizou uma leitura da fluorescência relativa ao cálcio a cada 1.52 segundos, contabilizando um total de 60 leituras por poço. Uma segunda placa contendo os reagentes UTP e ionomicina diluídos em 50  $\mu\text{L}$  de DPBS foi preparada e levada ao equipamento. A adição desses reagentes ocorreu no momento de 25 segundos e foi realizada através do sistema automático de pipetagem utilizando a seguinte setagem: 175  $\mu\text{L}$  de altura e taxa 3 (equivalente à adição de 47  $\mu\text{L}/\text{segundo}$ ). A fluorescência do corante foi obtida utilizando-se a modalidade de leitura *bottom read* nos seguintes comprimentos de onda: 485 nm (excitação) e 525 nm (emissão) (Hansen e Bräuner-Osborne, 2009). A análise dos resultados foi feita a partir do cálculo do  $\Delta\text{FU}$  (em unidades de fluorescência) mostrado na Equação 1.

$$\Delta\text{FU} = \text{valor do pico de fluorescência} - \text{valor da fluorescência basal} \quad (1)$$

### 2.4 Amostras de extratos utilizadas na mini-campanha de triagem

As amostras de extratos vegetais utilizadas no estudo pertencem a uma extratoteca institucional que abriga extratos oriundos de diversas espécies botânicas que foram coletadas em diferentes biomas brasileiros. Para os experimentos, eles foram ressuspensos em 1 mL de solução DPBS contendo 0,5% de dimetilsulfóxido (Sigma, EUA). É importante mencionar que os ensaios de triagem com os extratos foram executados de modo simples-cego, isto é, o profissional que realizava esses experimentos não tinha nenhum conhecimento acerca das espécies botânicas que originaram os extratos.

### 2.5 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata em pelo menos 3 dias independentes.

Primeiramente, foi utilizado o teste de normalidade de D'Agostino e Pearson com o objetivo de verificar se os dados seguiam uma distribuição gaussiana. Em caso positivo para esse tipo de distribuição, foi utilizado um teste paramétrico adequado para a análise dos resultados, enquanto que em caso negativo, foi utilizado um teste não-paramétrico. Os gráficos e as análises estatísticas foram produzidas com o auxílio do software *GraphPad Prism* versão 7 (GraphPad, EUA).

O fator  $z'$ , um cálculo matemático utilizado para prever a robustez do ensaio de cálcio, foi obtido a partir da Equação 2 (Zhang, Chung e Oldenburg, 1999).

$$z' = 1 - \frac{(3DP \text{ do controle positivo} + 3DP \text{ do controle negativo})}{(\text{média do controle positivo} - \text{média do controle negativo})} \quad (2)$$

onde as células estimuladas com o UTP [10  $\mu$ M] foram consideradas como o controle positivo, enquanto que as células estimuladas com o DPBS foram consideradas como o controle negativo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A padronização do protocolo de triagem utilizando o ensaio de mensuração de cálcio intracelular foi primordial para estabelecermos as condições ótimas para detectarmos amostras de extratos vegetais com potencial antagonista. Assim, um protocolo adequado além de apresentar sensibilidade suficiente para apontar amostras em potencial, também não deve gerar gastos excessivos com materiais consumíveis, o que é um importante fator a ser considerado durante a execução de campanhas de triagem (Zhang, Chung e Oldenburg, 1999).

Inicialmente, testamos alguns itens referentes ao carregamento das células. Foram eles: a solução de carregamento, o indicador de cálcio e a quantidade do corante.

Uma vez que a literatura apresenta uma variedade de opções de solução de carregamento empregadas em ensaios de cálcio, optamos por fazer uma comparação entre duas delas: meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol e PBS Dulbecco (DPBS). Contudo, não detectamos diferença significativa entre ambas as soluções após o estímulo com 5  $\mu$ M de ionomicina, um ionóforo de cálcio, como demonstrado na Tabela 1. Dessa forma, optamos por utilizar a solução de DPBS com a justificativa de redução de custos.

Posteriormente, fizemos uma comparação entre dois corantes distintos: Fluo-3 e Fluo-4. Novamente, estimulamos as células com 5  $\mu$ M de ionomicina, porém observamos que houve uma diferença significativa entre a média de fluorescência emitida por ambos os corantes como mostrado na Tabela 1. Nesse caso, optamos por trabalhar com o Fluo-4 devido à sua



eficiência na emissão de fluorescência, o que já está descrito na literatura (Gee *et al.*, 2000). Dessa forma, para obter-se uma intensidade de sinal de fluorescência similar ao Fluo-3, o Fluo-4 pode ser utilizado em menores concentrações, reduzindo assim, o gasto com reagentes (Gee *et al.*, 2000).

Uma vez escolhido o corante Fluo-4, o próximo passo consistiu na escolha da sua concentração. Para isso, carregamos as células da linhagem J774.G8 com concentrações entre 1 a 8  $\mu\text{M}$  de Fluo-4, e em seguida, as estimulamos com 100  $\mu\text{M}$  de ATP. Como pode ser observado na Tabela 1, todas as concentrações testadas foram capazes de detectar a mobilização de cálcio intracelular induzida pelo ATP na mesma faixa de intensidade de fluorescência, ou seja, de forma similar. Apesar dos dados sugerirem que o aumento da concentração do corante induz um aumento da fluorescência, somente foi possível constatar esse fato quando realizamos a uma comparação entre a fluorescência emitida entre as concentrações de 6 e 8  $\mu\text{M}$  com a concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Apesar disso, selecionamos a concentração de 2  $\mu\text{M}$  para a realização dos ensaios de cálcio, pois ela demonstrou sensibilidade similar às demais concentrações, bem como pelo seu uso em trabalhos citados na literatura (Luo *et al.*, 2011). Além disso, o uso de baixas concentrações do Fluo-4 pode reduzir o tamponamento do cálcio e um possível acúmulo de produtos tóxicos produzidos pela hidrólise de éster de acetoximetil, tais como o formaldeído e o ácido acético (Gee *et al.*, 2000).

**Tabela 1** – Variáveis testadas para a obtenção de um carregamento ótimo das células

Variável testada	Média de $\Delta$ FU	Análise estatística
<b>Solução de carregamento<sup>1</sup></b>	Meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol	103,7 ± 19,34
	PBS Dulbecco	112,8 ± 19,59
<b>Indicador de cálcio<sup>2</sup></b>	Fluo-3	85,47 ± 19,44
	Fluo-4	110,4 ± 13,83
<b>Concentração do corante (Fluo-4)<sup>3</sup></b>	1 $\mu$ M	67,54 ± 21,9
	2 $\mu$ M	79,51 ± 23,63
	3 $\mu$ M	86,17 ± 21,91
	4 $\mu$ M	92,93 ± 31,31
	6 $\mu$ M	104 ± 36,36
	8 $\mu$ M	104,2 ± 36,86

<sup>1</sup>Células J774.G8 carregadas com 2  $\mu$ M do indicador de cálcio Fluo-4AM em duas soluções de carregamento diferentes (meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol e PBS Dulbecco) e estimuladas com 5  $\mu$ M de ionomicina foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão da média de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados com o teste t não-emparelhado ( $p=0,3008$ ). ns representa ausência de diferença significativa.

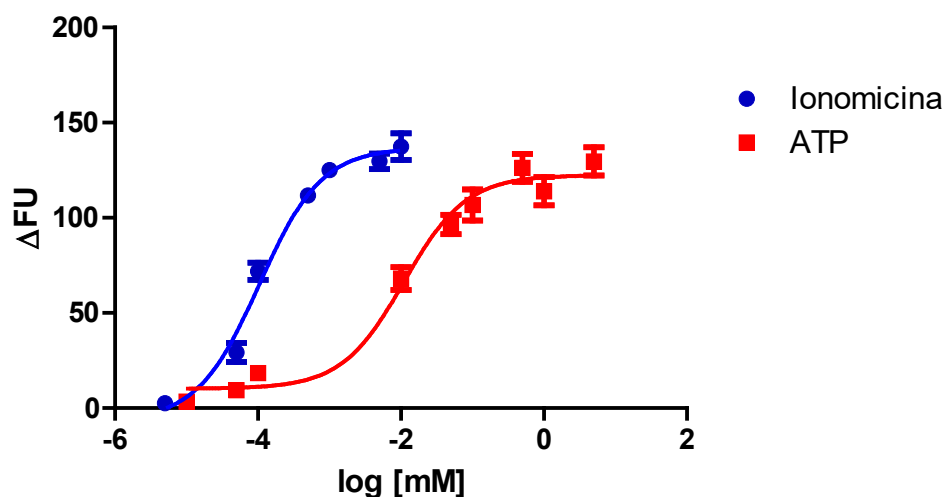
<sup>2</sup>Células J774.G8 carregadas com 2  $\mu$ M dos indicadores de cálcio Fluo-3AM e Fluo-4AM e estimuladas com 5  $\mu$ M de ionomicina foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados com o teste t não-emparelhado ( $p=0,0189$ ). ns representa ausência de diferença significativa.

<sup>3</sup>Células J774.G8 carregadas com diferentes concentrações de Fluo-4AM e estimuladas com 100  $\mu$ M de ATP foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e desvio padrão de 4 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata analisados com o teste one-way ANOVA e pós-teste Tukey ( $p=0,2686$ ). O (\*) simboliza diferença significativa em relação à concentração de 1  $\mu$ M. ns representa ausência de diferença significativa.

Uma vez definido os principais componentes do carregamento das células para a realização dos ensaios de cálcio, a próxima etapa consistiu na avaliação da sensibilidade do ensaio no leitor de placas. Para isso, estimulamos as células com concentrações crescentes de ATP e de ionomicina e observamos que a intensidade de fluorescência aumentou de

forma concentração-dependente, sendo encontrados os valores de  $EC_{50}$  de 11  $\mu$ M e 103 nM, respectivamente (Figura 1). Cabe ressaltar que o valor do  $EC_{50}$  encontrado na literatura para o ATP é de aproximadamente 10  $\mu$ M e varia de acordo com os subtipos de receptores P2 expressos na célula avaliada (Khakh e North, 2012) Por outro lado, o  $EC_{50}$  da ionomicina em alguns ensaios está situado em torno de 1  $\mu$ M (Ortmann *et al.*, 2011). Esses resultados indicam que as condições estabelecidas para o protocolo estão adequadas para a realização dos ensaios.

**Figura 1** - Curvas concentração-resposta da ionomicina e do ATP.

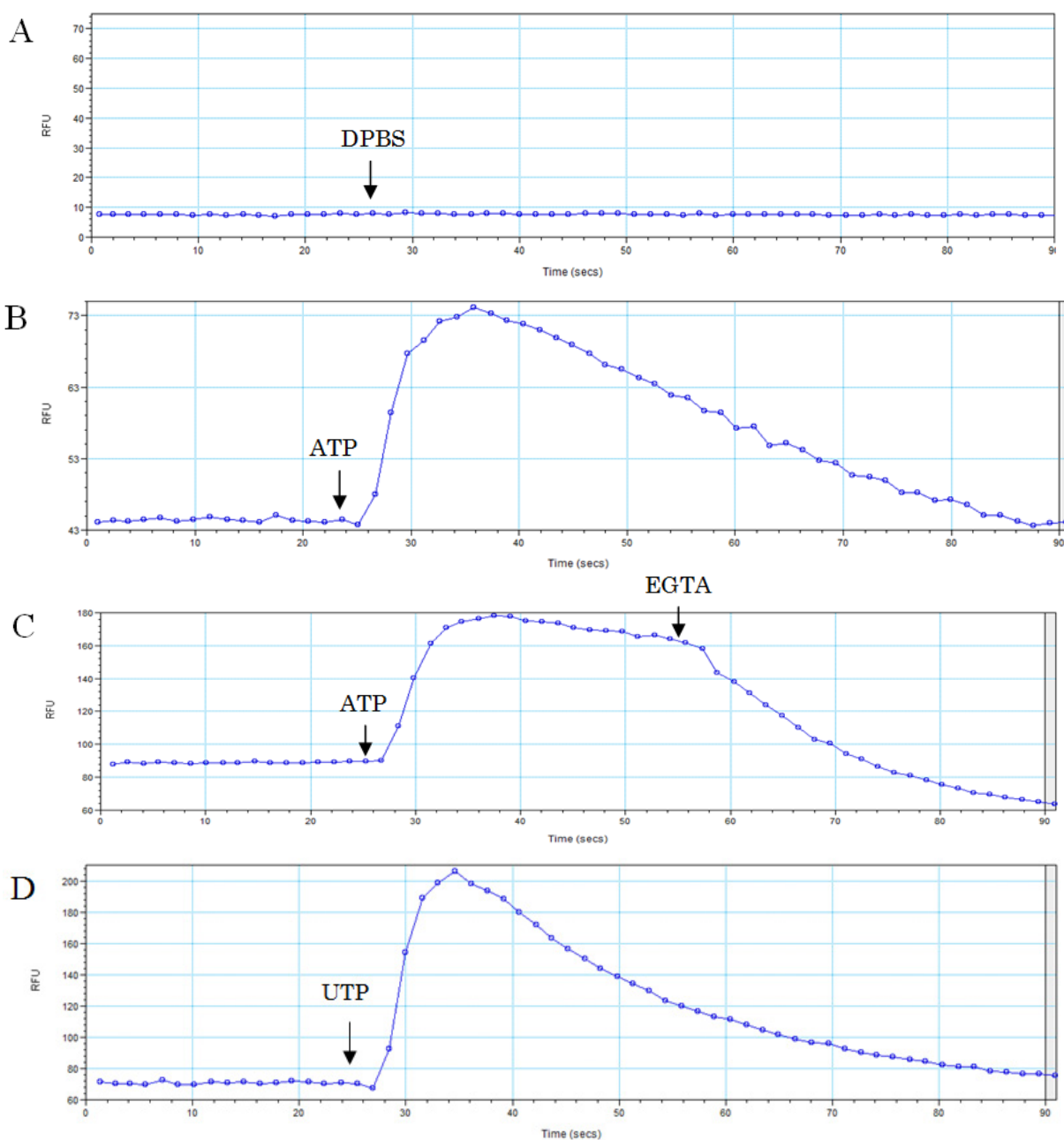


As curvas concentração-resposta foram obtidas em células J774.G8 carregadas com 2  $\mu$ M de Fluo-4 AM, estimuladas com concentrações crescentes de ionomicina e de ATP, e monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e erro padrão de 3 a 4 experimentos realizados em dias diferentes.

Finalizada a padronização do protocolo, analisamos o perfil de registros de cálcio produzidos através do leitor de placas. Com isso, observamos primeiramente, que o estímulo com o DPBS sozinho não ocasionou nenhuma variação do sinal nem provocou algum tipo de resposta mecanosensitiva (McClenaghan, Zeng e Verkuy, 2012), como mostrado na Figura 2A. Por outro lado, o estímulo com o ATP provocou um aumento do sinal fluorescência, o qual atingiu um pico após poucos segundos da sua adição e que foi seguido por um retorno ao nível basal de fluorescência, como pode ser visto na Figura 2B. Logo, esse perfil de resposta indica que houve uma mobilização transiente do cálcio intracelular, a qual foi interrompida através adição do quelante de cálcio EGTA (Figura 2C). Visto que o objetivo do ensaio é avaliar os receptores que também são ativados por UTP, estimulamos as células com esse agonista e obtivemos um perfil de resposta similar ao do ATP (Figura 2D). Além disso, as células também

responderam de forma concentração-dependente ao estímulo com o UTP, o que foi observado através da intensidade de fluorescência, e o valor de  $EC_{50}$  obtido foi de 1,021  $\mu$ M (Figura 3).

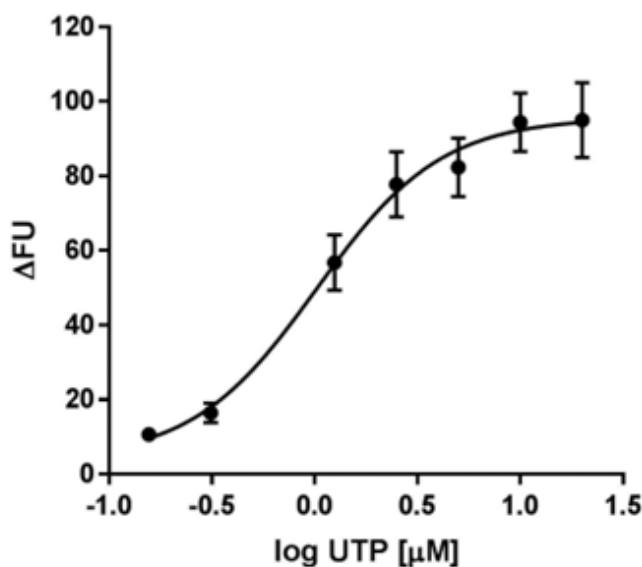
**Figura 2** - Perfil das respostas referentes à mobilização de cálcio intracelular obtidas no leitor de placas.



Registros originais dos sinais de cálcio obtidos no FlexStation III após a adição de DBPS (A), ATP

[100  $\mu\text{M}$ ] (B e C) e UTP [10  $\mu\text{M}$ ] (D) no tempo de 25 segundos e EGTA [20 mM] (54 segundos) (C) indicados pelas setas, em células J774.G8 carregadas com 2  $\mu\text{M}$  de Fluo-4AM. Imagens representativas de 3 experimentos realizados em dias diferentes em triplicata. Fonte: Ferreira *et al.*, 2019.

Figura 3 - Curva concentração-resposta do UTP.



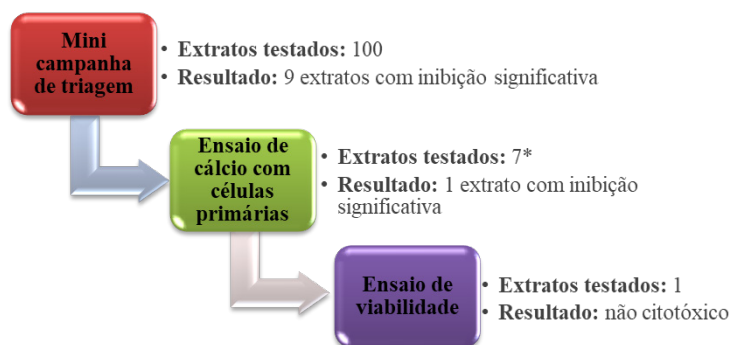
A curva concentração-resposta do ATP foi obtida a partir de células J774.G8 carregadas com 2  $\mu\text{M}$  de Fluo-4 AM, estimuladas com diferentes concentrações de UTP e monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e erro padrão de 3 experimentos realizados em dias diferentes. Fonte: Ferreira *et al.*, 2019.

Finalmente, mensuramos a robustez do protocolo padronizado através do cálculo do fator  $z'$ . O fator  $z'$  funciona como um parâmetro estatístico para avaliar se um protocolo está adequado para uso (Zhang, Chung e Oldenburg, 1999). Aplicando os devidos cálculos, obtivemos um valor de 0,645, o qual se encontra na faixa ótima para execução de ensaios, isto é, fator  $z' \geq 0,5$ . Cabe ressaltar que algumas campanhas de triagem de alto desempenho utilizando ensaios similares apresentaram valor do fator  $z'$  entre 0,60 e 0,80 (Ito *et al.*, 2017; Valentin *et al.*, 2011). Além disso, parece que o uso de células transfectadas pode contribuir para um aumento do fator  $z'$ . Todavia, a transfecção pode gerar um gasto extra com reagentes. Assim, optamos por manter o ensaio aplicado à triagem com a linhagem que naturalmente expressa os receptores alvos, isto é, os receptores P2Y2 e P2Y4, enquanto que planejamos o uso de células transfectadas em um segundo momento a fim de confirmar o efeito antagonista

das amostras candidatas.

Encerrada a etapa de padronização, iniciamos uma mini-campanha de triagem utilizando amostras de extratos vegetais da flora brasileira, a qual abriga uma grande diversidade em termos de espécies e de moléculas contendo diferentes estruturas químicas. Dessa forma, foram testados 100 extratos vegetais em uma única concentração de corte (50 µg/mL). Dentre eles, 9 extratos reduziram a mobilização de cálcio intracelular induzida pelo UTP em torno de 19 a 90%. Esses extratos candidatos (ou *hits*) foram testados novamente em macrófagos peritoneais murinos, os quais expressam alguns receptores P2, e os resultados mostraram que apenas o extrato de galhos de *Joannesia princeps* Vell. inibiu significativamente a mobilização de cálcio nessas células. Esse resultado sugere que há diferenças em termos de resposta entre a linhagem celular e a célula primária. O extrato de *J. princeps* Vell. foi submetido a um teste de viabilidade através da técnica de MTT, no qual foi demonstrado que ele não apresentou toxicidade para células, ou seja, a inibição da mobilização de cálcio provocada por ele não está relacionada com a morte celular. Uma síntese desses principais achados pode ser observada na Figura 4.

**Figura 4** - Síntese dos resultados da mini-campanha de triagem.



Inicialmente foram testados 100 extratos vegetais, dos quais 9 inibiram significativamente a mobilização de cálcio induzida pelo UTP. Esses extratos candidatos foram testados novamente com células primárias<sup>1</sup> e desses, apenas 1 inibiu significativamente a mobilização de cálcio

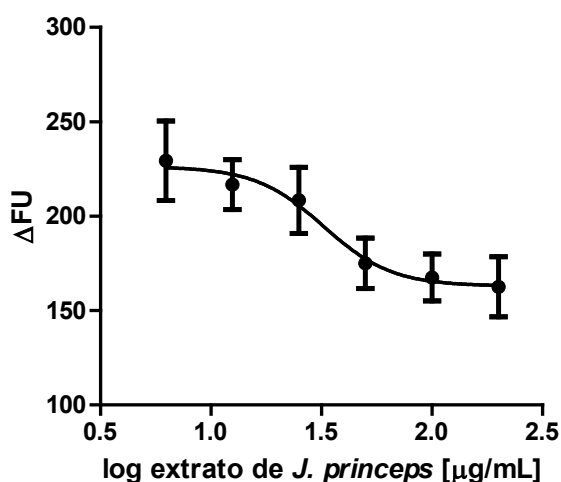
1 Os experimentos utilizando macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 machos seguiram o mesmo protocolo. Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de



induzida pelo UTP. Por fim, esse único extrato foi conduzido a um teste de viabilidade celular através da técnica de MTT e não demonstrou citotoxicidade<sup>2</sup>.

O pré-tratamento com concentrações crescentes do extrato de *J. princeps* Vell. resultou ainda na inibição da mobilização de cálcio intracelular de forma concentração-dependente, apresentando um IC<sub>50</sub> de 32,32 µg/mL (Figura 5). Além disso, dados recentes do nosso laboratório demonstraram que esse extrato foi capaz de inibir a mobilização de cálcio induzida pelo 2-thio-UTP e pelo MRS4062, os quais são agonistas seletivos dos receptores P2Y2 e P2Y4, respectivamente, corroborando com os dados obtidos após o estímulo com o UTP (Ferreira, 2019).

**Figura 5** - Curva concentração-resposta do extrato de galhos de *J. princeps* Vell.



A curva concentração-resposta do extrato de galhos de *J. princeps* Vell. foi obtida a partir de células J774.G8 carregadas com 2 µM de Fluo-4 AM e pré-tratadas com concentrações crescentes do extrato. Em seguida, as células foram estimuladas com UTP [10 µM] e foram monitoradas no FlexStation III por 90 segundos. Média e erro padrão de 4 experimentos realizados em dias diferentes. Fonte: Ferreira *et al.*, 2019.

A *Joannesia princeps* Vell., popularmente conhecida como “cotieira” ou “boleira”, é uma espécie botânica pertencente ao gênero Euphorbiaceae. Essa árvore pode medir até cerca de 20 metros de altura e é encontrada no Brasil e em algumas regiões dos continentes africano e asiático. As suas sementes apresentam comprovada ação laxativa, cicatrizante, antiparasitária e anti-helmíntica (Donato-Trancoso *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2007). Todavia, os estudos que

ética sobre o uso de animais do Instituto Oswaldo Cruz, sob a licença número 037/2017.

<sup>2</sup> Para a descrição do protocolo de MTT utilizado, vide (Ferreira *et al.*, 2019).

\*Nessa etapa foram testados apenas 7 extratos ao invés de 9, devido a escassez de amostra de 2 extratos.

demonstram as propriedades medicinais de outras partes dessa planta, como os galhos, ainda são bastante escassos. Nesse sentido, a nossa perspectiva é realizar novos experimentos com as frações desse extrato visando identificar a(s) molécula(s) responsável(is) por esse efeito inibitório, além de investigar se o referido extrato apresenta efeitos antiinflamatório e analgésico em modelos *in vivo*.

## 4 CONCLUSÃO

Nesse trabalho demonstramos as condições ideais para a condução de ensaios de mensuração de cálcio intracelular em leitor de placas, o qual apresentou um valor de fator  $z'$  que comprova a sua adequação para triagem. Esse mesmo ensaio foi aplicado a uma mini-campanha de triagem de alto desempenho e apontou para a descoberta da potencial atividade antagonista do extrato de galhos de *J. princeps* Vell. sobre os receptores P2Y2 e P2Y4.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos órgãos de fomento CNPq e Faperj e ao Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro. Agradecemos ainda à técnica Fátima Regina Marques pela assistência com os extratos, e às Plataformas de Bioprospecção e Bioensaios e Triagem de Fármacos da Fundação Oswaldo Cruz.

## REFERÊNCIAS

- BRUTON, J. D.; CHENG, A. J.; WESTERBLAD, H. **Methods to detect Ca(2+) in living cells**. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 740, p. 27–43, 2012.
- CHADET, S.; JELASSI, B.; WANNOUS, R.; ANGOULVANT, D.; CHEVALIER, S.; BESSON, P.; ROGER, S. **The activation of P2Y2 receptors increases MCF-7 breast cancer cells migration through the MEK-ERK1/2 signalling pathway**. *Carcinogenesis*, v. 35, n. 6, p. 1238–1247, 2014.
- CHOI, J. H.; JI, Y. G.; LEE, D. H. **Uridine triphosphate increases proliferation of human cancerous pancreatic duct epithelial cells by activating P2Y2 receptor**. *Pancreas*, v. 42, n. 4, p. 680–686, maio 2013.
- CODDOU, C.; YAN, Z.; OBSIL, T.; HUIDOBRO-TORO, J. P.; STOJILKOVIC, S. S. **Activation and regulation of purinergic P2X**. *Pharmacological Reviews*, v. 63, n. 3, p. 641–683, 2011.
- COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M.; GÓRECKI, D. C.; PERSECHINI, P. M.; BISAGGIO, R. C.; MENDES, A. N.; MARKS, J.; BURNSTOCK, G.; DUNN, P. M. **Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages**. *Biochemical Pharmacology*, v. 69, n. 4, p. 641–655, 2005.
- DONATO-TRANCOSO, A.; GONÇALVES, L.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; SILVA, F. DE A. DA; ROMANA-SOUZA, B. **Seed oil of *Joannesia princeps* improves cutaneous wound closure in experimental mice**. *Acta Histochemica*, v. 116, n. 7, p. 1169–1177, 2014.
- EUN, S. Y.; PARK, S. W.; LEE, J. H.; CHANG, K. C.; KIM, H. J. **P2Y2R activation by nucleotides released from oxLDL-treated endothelial cells (ECs) mediates the interaction between ECs and immune cells through RAGE expression and reactive oxygen species production**. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 69, p. 157–166, 2014.

- EUN, S. Y.; SEO, J.; PARK, S. W.; LEE, J. H.; CHANG, K. C.; KIM, H. J. **LPS potentiates nucleotide-induced inflammatory gene expression in macrophages via the upregulation of P2Y2 receptor.** *International Immunopharmacology*, v. 18, n. 2, p. 270–276, 2014.
- FERREIRA, N. C. DA S. **Identificação de novos antagonistas para receptores purinérgicos P2.** Fundação Oswaldo Cruz, 2019.
- FERREIRA, N. C. DA S.; SOARES-BEZERRA, R. J.; SILVEIRA, R. F. C. DA; SILVA, C. M. DA; OLIVEIRA, C. S. DE; CALHEIROS, A. S.; ALVES, T. M.; ZANI, C. L.; ALVES, L. A. **New insights in purinergic therapy: Novel antagonists for uridine 5'-triphosphate-activated P2Y receptors from Brazilian flora.** *Journal of Medicinal Food*, v. 22, n. 2, p. 211–224, 2019.
- GEE, K. R.; BROWN, K. A.; CHEN, W.-N. U.; BISHOP-STEWART, J.; GRAY, D.; JOHNSON, I. **Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca<sup>2+</sup>-indicator dyes.** *Cell Calcium*, v. 27, n. 2, p. 97–106, fev. 2000.
- HANSEN, K. B.; BRÄUNER-OSBORNE, H. FLIPR® Assays of Intracellular Calcium in GPCR Drug Discovery. *In: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. v. 552, p. 269–278.
- ITO, M.; EGASHIRA, S.; YOSHIDA, K.; MINENO, T.; KUMAGAI, K.; KOJIMA, H.; OKABE, T.; NAGANO, T.; UI, M.; MATSUOKA, I. **Identification of novel selective P2Y6 receptor antagonists by high-throughput screening assay.** *Life Sciences*, v. 180, p. 137–142, 2017.
- JIN, H.; EUN, S. Y.; LEE, J. S. J. H.; PARK, S. W.; LEE, J. S. J. H.; CHANG, K. C.; KIM, H. J. **P2Y2 receptor activation by nucleotides released from highly metastatic breast cancer cells increases tumor growth and invasion via crosstalk with endothelial cells.** *Breast cancer research: BCR*, v. 16, n. 5, p. R77, 2014.
- KACZMAREK-HÁJEK, K.; LÖRINCZI, É.; HAUSMANN, R.; NICKE, A. **Molecular and functional properties of P2X receptors-recent progress and persisting challenges.** *Purinergic Signalling*, v. 8, n. 3, p. 375–417, 2012.
- KHAKH, B. S.; NORTH, R. A. **Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS.** *Neuron*, v. 76, n. 1, p. 51–69, 2012.
- VON KÜGELGEN, I. **Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes.** *Pharmacology and Therapeutics*, v. 110, n. 3, p. 415–432, 2006.
- VON KÜGELGEN, I.; HOFFMANN, K. **Pharmacology and structure of P2Y receptors.** *Neuropharmacology*, v. 104, p. 50–61, 2016.
- LI, W.-H.; QIU, Y.; ZHANG, H.-Q.; LIU, Y.; YOU, J.-F.; TIAN, X.-X.; FANG, W.-G. **P2Y2 receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells.** *British Journal of Cancer*, v. 109, n. 6, p. 1666–1675, 2013.
- LUO, J.; ZHU, Y.; ZHU, M. X.; HU, H. **Cell-based calcium assay for medium to high throughput screening of TRP channel functions using FlexStation 3.** *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n. 54, 17 ago. 2011.
- McCLENAGHAN, C.; ZENG, F.; VERKUYL, J. **TRPA1 agonist activity of probenecid desensitizes channel responses: consequences for screening.** *ASSAY and Drug Development Technologies*, v. 10, n. 6, p. 533–41, 2012.
- ORTMANN, B.; VALENTIN, S.; ATZE, K.; BREUER, N.; FRANKE, S.; KÜHN, M.; BRUIN, L. **Monitoring Intracellular Ca<sup>2+</sup> Fluxes with Clonetics™ primary sensors using the LUMIstar Omega.** *Application Note 216*, 2011.
- QIU, Y.; LIU, Y.; LI, W.-H.; ZHANG, H.-Q.; TIAN, X.-X.; FANG, W.-G. **P2Y2 receptor promotes the migration and invasion of breast cancer cells via EMT-related genes Snail and E-cadherin.** *Oncology Reports*, v. 39, n. 1, p. 138–150, 2018.
- RAFEHI, M.; MÜLLER, C. E. **Tools and drugs for uracil nucleotide-activated P2Y receptors.** *Pharmacology & Therapeutics*, v. 190, p. 24–80, 2018.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. **Receptors for purines and pyrimidines.** *Pharmacological Reviews*, v. 50, n. 3, p. 413–492, 1998.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Farmacologia.** 7th. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- SOUSA, O. V. DE; FIORAVANTE, I. A.; YAMAMOTO, C. H.; ALVES, M. S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ARAÚJO, A. DA L. A. DE. **Propriedades biológicas das sementes de *Joannesia princeps* Vellozo.** *HU Revista*, v. 33, n. 1, p. 23–27, 2007.

SULLIVAN, E.; TUCKER, E. M.; DALE, I. L. **Measurement of [Ca<sup>2+</sup>] using the Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR)**. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 114, p. 125–33, 1999.

VALENTIN, S.; ORTMANN, B.; ATZE, K.; BREUER, N.; FRANKE, S.; KÜHN, M.; FAUST, N. **New tools for drug discovery: Monitoring intracellular Ca<sup>2+</sup> fluxes in primary cell types with high-throughput formats**, 2011. Disponível em: <[http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_Posters\\_New\\_Tools\\_for\\_Drug\\_Discovery\\_Monitoring\\_Intracellular\\_Ca2\\_Fluxes\\_in\\_Primary\\_Cell\\_Types\\_with\\_High-Throughput\\_Formats.pdf](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_Posters_New_Tools_for_Drug_Discovery_Monitoring_Intracellular_Ca2_Fluxes_in_Primary_Cell_Types_with_High-Throughput_Formats.pdf)>. Acesso em: 9 out. 2017

XIE, R.; XU, J.; WEN, G.; JIN, H.; LIU, X.; YANG, Y.; JI, B.; JIANG, Y.; SONG, P.; DONG, H.; TUO, B. **The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 27, p. 19137–49, 2014.

ZHANG, J.-H.; CHUNG; OLDENBURG. **A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays**. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 4, n. 2, p. 67–73, 1999.

ZIZZO, M. G.; MASTROPAOLO, M.; GRÄHLERT, J.; MULÈ, F.; SERIO, R. **Pharmacological characterization of uracil nucleotide-preferring P2Y receptors modulating intestinal motility: a study on mouse ileum**. *Purinergic Signalling*, v. 8, n. 2, p. 275–85, 2012.

## HIGH-THROUGHPUT SCREENING USING INTRACELLULAR CALCIUM MEASUREMENT ASSAY APPLIED TO THE DISCOVERY OF ANTAGONISTS FOR P2Y2 AND P2Y4 PURINERGIC RECEPTORS

**Abstract** – P2Y2 and P2Y4 receptors are purinergic receptors physiologically activated by UTP and ATP. They are expressed in different tissues in humans, where they promote a series of physiological effects, including intracellular calcium mobilization. The inhibition of these receptors can generate anti-inflammatory, analgesic, antimetastatic, and laxative effects, which demonstrate its therapeutic potential. However, the scarcity of antagonists makes it difficult to implement drugs that act on these receptors in therapy, stimulating the search for new molecules with this activity. Given this, the objective of this work was to standardize a high-throughput screening methodology capable of identifying new antagonists for P2Y2 and P2Y4 receptors. This methodology is based on intracellular calcium levels measurement, whose protocol was tested and optimized to provide the appropriate conditions for carrying out the assays. Moreover, increasing concentrations of ionomycin, ATP, and UTP were tested to assess the sensitivity of the equipment. Thus, we obtained EC<sub>50</sub> values of 103 nM, 10 μM, and 1.021 μM, respectively. Finally, a mini high-throughput screening campaign was conducted using samples of plant extracts. These experiments revealed that the extract from stems of *Joannesia princeps* Vell. was able to inhibit intracellular calcium mobilization in a concentration-dependent manner, presenting an IC<sub>50</sub> of 32.32 μg/mL. Therefore, the standardized methodology was able to identify new antagonists for P2Y2 and P2Y4 receptors of natural origin.

**Keywords:** screening, calcium, P2Y receptors, UTP.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Agentes 40-44, 48-50, 81  
Alcaloide 72  
Amostras 12-14, 25-28, 31-35, 49, 80, 83, 84, 90  
Antimoniais 67, 68  
ATP 70, 80, 81, 85-89, 93

### B

B2R 11, 12, 16-20  
Biópsia 23, 25, 27, 28, 31-35

### C

Cálcio intracelular 80, 82-85, 88, 90-92  
Câncer 40, 42, 49-52, 92, 93  
Cardiomiopatia 23  
Cardiopata 24, 33  
Células 40-50, 66, 69, 73, 81-87, 89-91  
*Checkpoint* 41, 43, 50, 51  
Ciliados 53-56, 61  
*Ciliophora* 53-58, 63, 64  
Cininas 10, 11, 17-19  
Coalescência 53, 56-59, 61  
COI 59, 62, 63  
Concentração 47, 65, 75, 80, 82, 85-91  
Creatinina 10, 13, 18

### D

DDR 40, 42, 52  
DNA 25, 27, 28, 30-34, 36, 38-41, 43, 47, 50-52, 54, 59, 63, 64, 69, 70  
Docking 76  
Doença de Chagas 23, 24, 26, 27, 33, 36, 37  
DTU 23, 26, 34, 35, 39

### E

Enzima 24, 29, 34, 47, 55, 65, 68-70, 73-75, 77  
Etoposídeo 44, 47, 48  
Eucariontes 53  
Evolução molecular 53  
Expressão 10, 14, 16, 18-20, 31, 43, 49  
Extratos 44, 65, 71, 73, 74, 77, 80, 83, 84, 90-92

## F

Fenômeno 41, 57  
Filogenia 53-60  
Flavonoides 71, 72, 74, 75, 77

## G

GBM 40, 42, 43, 46-49, 52  
Glicerol 10-12, 15-20  
Glioblastoma 40, 42, 44, 48-52

## H

*Heterotrichea* 53, 58-64  
Histomorfometria 16

## I

*Incomplete lineage sorting* 56, 57  
Indicador 82-84, 86  
Iniciadores 28-30  
Insuficiência cardíaca 24  
Irradiação 42, 43, 45, 46, 48, 49

## L

LdNH 65, 74-77, 79  
*Leishmania* 65-72, 74, 77-79  
Leishmaniose 65-69, 72, 78  
Lesão 10, 11, 14, 16-19, 81  
*Locus* 54-57, 59

## M

Mortalidade 24, 31  
Mutação 57

## P

P2Y2 80-82, 89, 91-94  
P2Y4 80-82, 94  
Pacientes 11, 23-28, 30-35, 35, 42, 46, 49, 68, 69  
Parasitose 24  
PCR 23, 25, 27, 28, 30-33, 36-39, 59  
Polimerase 14, 23, 37, 41  
População 26, 57, 58  
Protistas 53

## Q

Quimioterápicos 43, 44, 70



## R

Rabdomiólise 10-12, 17, 18, 20

Radiação ionizante 41-46, 48, 49

Reativação chagásica 25, 30

Receptor 8, 10, 11, 15-22, 35, 80-82, 87, 89-94

Receptores 10, 11, 18, 19, 80-82, 87, 89-93

Renal 11, 13, 15, 16, 18-22, 37

Riboclasse 55

Rins 10, 19, 20, 81

RNA 38, 51, 52, 54, 63

## S

STAR 59

## T

Temozolomida 40, 42

Transplante 23-27, 30, 31, 33, 35, 36, 39

Tratamento 12, 19, 23-25, 27, 30, 33, 35, 36, 42-44, 47-49, 65, 67-69, 73, 81

Triagem 74, 77, 80, 82-84, 89, 90, 92

*Trypanosoma cruzi* 23, 36-39

Tumor 40-42, 48, 49, 51, 52, 81, 93

## U

Ureia 10, 13, 15

UTP 80, 81, 83, 84, 89-91, 94

## **SOBRE A ORGANIZADORA**

### **Natiele Carla da Silva Ferreira**

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro - Faculdade de Formação de Professores. Atualmente, trabalha na execução de screening virtual através da técnica de docking molecular para a identificação de moléculas com atividade antagonista sobre o receptor P2X7. Além disso, vem se dedicando ao estudo e implementação de screening virtual utilizando algoritmos de machine learning, a fim de descobrir de novos antagonistas para o receptor P2X7. Possui experiência em receptores purinérgicos, produtos naturais, triagem em alta vazão, docking molecular e Farmacologia, além de ser co-inventora de uma patente depositada no INPI sob o número de registro BR1020140308970.



## Estudos Avançados em Genética e Farmacologia

[www.bookerfield.com](http://www.bookerfield.com) 

[contato@bookerfield.com](mailto:contato@bookerfield.com) 

[@bookerfield](https://www.instagram.com/bookerfield) 

Bookerfield Editora 



# Estudos Avançados em Genética e Farmacologia

[www.bookerfield.com](http://www.bookerfield.com) 

[contato@bookerfield.com](mailto:contato@bookerfield.com) 

[@bookerfield](https://www.instagram.com/bookerfield) 

Bookerfield Editora 

ISBN 978-658992956-7

