

AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DAS FRAÇÕES DE ALTO E BAIXO PESO MOLECULAR DE *Trichoderma stromaticum* SOBRE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*.

Melissa Ercília Santos Matos¹, Jane Lima dos Santos², Danielle Oliveira dos Anjos³

¹Discente do Curso de Biomedicina DCB/UESC

²Docente do Departamento de Ciência Biológicas/UESC

³Professora orientadora deste projeto - DCR/FAPESB-CNPq/UESC.

Resumo

A Doença de Chagas é um importante problema de saúde pública com elevados índices de mortalidade. A doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. O parasito está presente no intestino do *Triatoma infestans* inseto vetor da doença e é transmitida ao hospedeiro vertebrado através das fezes contaminadas do inseto, durante a hematofagia. Estima-se que exista pelo menos um milhão de pessoas infectadas pelo protozoário no Brasil. Os medicamentos utilizados para o tratamento da doença são: O benznidazol e o nifurtimox, ambos apresentam toxicidade para os pacientes. O fungo *Trichoderma stromaticum* apresenta uma alternativa promissora visto que o extrato e as frações obtidas de fungo do gênero *Trichoderma sp* apresentam atividade contra protozoários do gênero *Leishmania sp*, *Toxoplasma sp* e *Trypanosoma sp*. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade das frações de alto e baixo peso molecular obtidas do extrato do fungo *T. stromaticum* sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para avaliação da citotoxicidade das frações desse extrato, foi realizado um ensaio com o MTT (3-(4, 5-dimetiltriazol-2-il) 2,5difenil tetrazólio brometo tetrazol), no qual os parasitos foram submetidos as frações em concentrações que variavam entre 0,06 µg/µL a 0,9 µg/µL por 24 horas. Os resultados obtidos mostraram que o extrato e suas frações apresentam citotoxicidade sobre as epimastigotas. A fração de alto peso molecular reduziu a viabilidade dos parasitos de 50 a 70% nas concentrações de 0,06 µg/µL e 0,9 µg/µL. Já a fração de baixo peso molecular reduziu 40 a 80% nas concentrações de 0,075 µg/µL e 0,608 µg/µL. Análise por microscopia eletrônica de varredura dos parasitos tratados com as frações do fungo revelou alterações morfológicas na região posterior do parasito, onde fica localizado o cinetoplasto, além de destruição da membrana plasmática do protozoário. As frações de alto e baixo peso molecular do *T. stromaticum* apresentam potencial atividade citotóxica contra *T. cruzi* podendo ser futuramente uma fonte alternativa para o tratamento da doença de Chagas.

Autorização legal: Não se aplica.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Quimioterapia; Microscopia eletrônica.

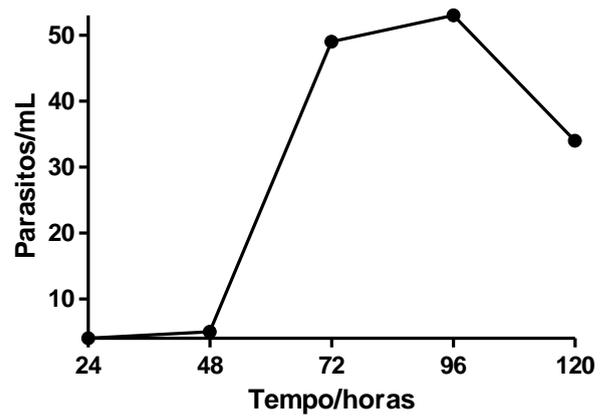
Apoio financeiro: Fapesb, UESC e ICB.

Trabalho selecionado para a JNIC: UESC

Introdução

A Tripanossomíase americana ou Doença de Chagas é uma antropozoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado. Segundo o Ministério da Saúde, a região Norte do Brasil apresenta os maiores índices da doença e um dos principais modos de transmissão nessa região ocorre através da ingestão de frutos contaminados. Os tripanossomas podem se apresentar nas formas amastigotas, esferomastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. (NEVES, 2014). A transmissão da doença pode ocorrer pela inoculação de tripomastigotas metacíclicas através da picada do *Triatoma infestans* infectado, pela transmissão congênita e oral. Sendo que, essas duas últimas formas de transmissão são consideradas secundárias. (VINHAES et al., 2000; DIAS, 2000). O hospedeiro vertebrado apresenta lesões teciduais devido à resposta imunológica prolongada ao parasita. Esse quadro pode se agravar com a ocorrência de lesões progressivas, associadas a inflamação e fibrose, em pacientes na fase crônica da doença (NEVES, 2014). A forma epimastigota, presente no ciclo de vida do protozoário, é não- infectante e replicativa. A mesma pode se reproduzi assexuadamente por divisão binária dando origem a forma infectante tripomastigota metacíclica. Atualmente, os fármacos utilizados no tratamento da doença são tóxicos, causando diversos efeitos colaterais, por isso tornam-se necessárias o desenvolvimento de novos medicamentos como alternativa para o controle da tripanossomíase. Em vista disso, o fungo *Trichoderma stromaticum*, que apresenta potencial biotecnológico e tem um importante papel como método natural e ecológico de controle biológico, já utilizado no controle de Leishmaniose, tem sido estudado como alternativa aos métodos químicos empregados no controle da Tripanossomíase, através da produção de metabólitos que inibem o desenvolvimento da epimastigota de *T. cruzi* (SAITO et al, 2009). Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade citotóxica das frações de alto e baixo peso molecular do fungo *T. stromaticum* sobre a forma epimastigota de *T. cruzi*.

Figura 2: Curva de crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi*. Número de parasitos observados durante 24h, 48h, 72h, 96h e 120 horas.



As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram submetidas às frações de alto e baixo peso molecular do extrato do fungo *Trichoderma stromaticum*. Assim, foi possível observar que a epimastigota no controle cresceu conforme esperado, seguindo a fase lag, fase log, fase estacionária e fase de declínio (TORTORA, 2012). Enquanto, a forma epimastigota que foi submetida à fração de baixo peso molecular sofreu declínio a partir do 3º dia de tratamento, e a epimastigota submetida a fração de alto peso não apresentou crescimento, entrando em declínio a partir do 2º dia de tratamento (Fig.3),

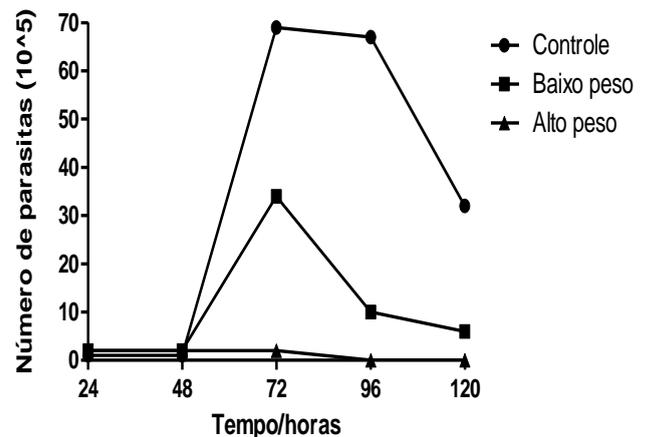
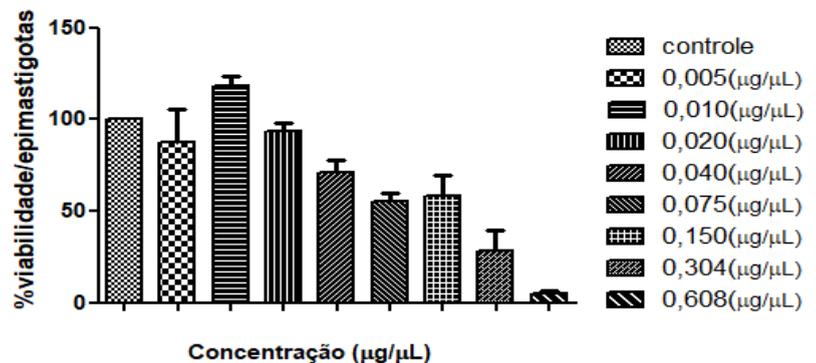


Figura 3: Curva de crescimento da forma epimastigota de *T. cruzi* submetida ao extrato de *T. stromaticum*, a fração de baixo e a de alto peso molecular. Número de parasitos observados durante 24, 48, 72, 96 e 120h.

4.3 Avaliação da citotoxicidade das frações de alto e baixo peso molecular obtidas do fungo *Trichoderma stromaticum* sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

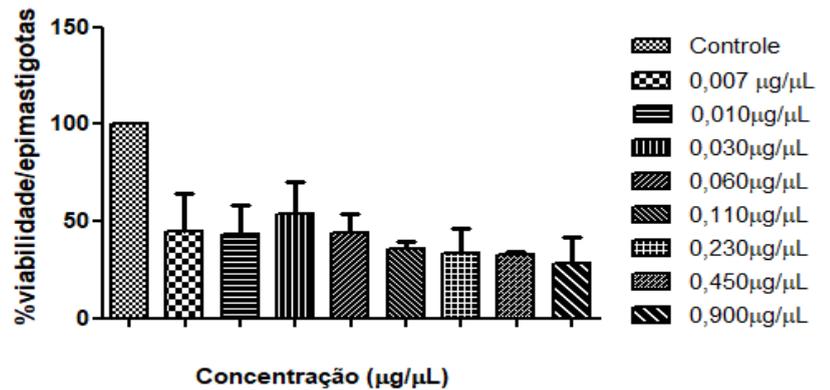
A viabilidade dos parasitos submetidos a fração de baixo peso molecular reduziu em torno de 40 a 80% nas concentrações 0,075 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,608 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O aumento da concentração da fração de baixo peso molecular obtida do *T. stromaticum* foi acompanhado da diminuição da viabilidade dos parasitos (Fig.4).

Figura 4: Avaliação da citotoxicidade em formas epimastigotas de *T. cruzi*, pelo método MTT. Número de parasitos viáveis representados em porcentagem em diferentes concentrações do extrato de *T. stromaticum* de baixo peso molecular.



A viabilidade dos parasitos submetidos a fração de alto peso molecular reduziu em torno de 50 a 70% nas concentrações 0,06 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O aumento da concentração da fração de alto peso foi acompanhado da redução da viabilidade dos parasitos. Ao comparar a diminuição da viabilidade dos parasitos que foram submetidos às frações de baixo e alto peso molecular do *T. stromaticum* é possível observar que a fração de alto peso foi responsável por uma maior redução a viabilidade da forma epimastigota de *T. cruzi*. (Fig. 5). Os resultados ocorreram conforme esperado, uma vez que, a fração de baixo peso molecular foi responsável por uma maior redução da viabilidade dos parasitos em relação a fração de alto peso molecular (LOPES, 2017).

Figura 5: Avaliação da citotoxicidade em formas epimastigotas de *T. cruzi*, pelo método MTT. Número de parasitos viáveis representados em porcentagem em diferentes concentrações do extrato de *T. stromaticum* de alto peso

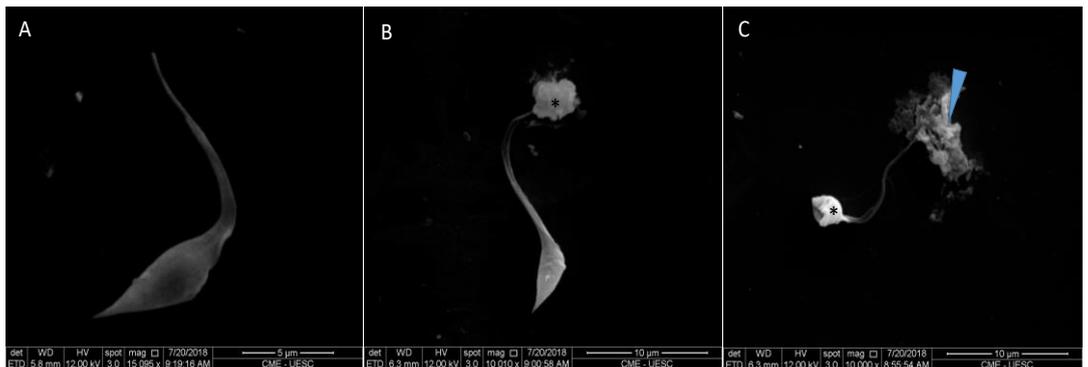


4.4 Mecanismo de ação das frações obtidas do fungo de *T. stromaticum* em formas epimastigotas de *T. cruzi* através da análise ultraestrutural.

A análise das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura revelou que a forma epimastigota de *T. cruzi* no controle apresentou morfologia normal, característica da forma evolutiva do parasito (Fig.6A). Enquanto, as epimastigotas submetidas às frações de baixo apresentaram alterações no corpo e desintegração do flagelo. O observado pode ser consequência da ação dos componentes dessa fração, provocando um aumento da atividade de excitose (LOPES, 2017). As frações de alto peso molecular também causaram modificações na estrutura do protozoário, com completa destruição do flagelo, em vista da desintegração de microtúbulos (Fig. 6B-C).

Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

(A) Controle de forma epimastigota



apresentando morfologia sem alteração; (B) Epimastigota tratada com fração de alto peso molecular do extrato de *T. stromaticum*; (C) Epimastigota tratada com fração de baixo peso molecular do extrato de *T. stromaticum*.

Conclusões

As frações de alto e baixo peso molecular obtidas a partir do fungo *Trichoderma stromaticum* apresentam alta citotoxicidade sobre as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. E a fração de alto peso molecular apresenta maior potencial contra as epimastigotas quando comparada à fração de baixo peso molecular.

Referências bibliográficas

ANJOS, D. O. **Effects of a novel belapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis.** Elsevier, 2016.

NEVES, D. P.; FILIPPIS, T. **Parasitologia Básica**, 3ed. 2014;

SAITO, L. R. et al. **Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. No biocontrole de patógenos de culturas agrícolas.** Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia. V.2, N.3, Set- Dez. 2009.

LOPES, D.S. **Efeitos do extrato do fungo *Trichoderma asperelloides* no controle de protozoários da espécie *Leishmania amazonensis*.** 2017. 68f. Dissertação de Pós-graduação. Universidade Estadual de Santa Cruz, 2017. [Orientadora: Profa. Dra. Jane Lima dos Santos].

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**, 10ed. 2012.

VINHAES, C. M.; DIAS, J.C.P. **Doença de Chagas no Brasil.** Cadernos de Saúde Pública, v. 16, p. 7-12, 2000.