

Seres minúsculos em redes gigantescas

Priscila Silva Sampaio de Souza*, Mariana Thomaz Tobias, Larissa Figueiredo Alves Diniz, Daniel Sousa da Rocha, Karina Alves Toledo

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Câmpus de Assis. Departamento de Ciências Biológicas. Av. Dom Antonio, 2100. Parque Universitário. CEP 19806-900, Assis, SP.

*priscilasampaiosouza@gmail.com

Palavras-chave: Doença de Chagas, Netose, Neutrófilos, *Trypanosoma cruzi*.

Doenças causadas por protozoários (microrganismos unicelulares) representam um grave problema de saúde pública devido ao alto índice de mortalidade que causam. A Doença de Chagas tem como agente etiológico, ou seja, agente causador da doença, um **parasita** chamado *Trypanosoma cruzi*. Este parasita pode infectar o ser humano após uma picada do inseto popularmente chamado de barbeiro, que defeca no local da picada. A pessoa se contamina com os parasitas presentes nas fezes do inseto ao coçar o local da picada. Atualmente, 10 a 16 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo parasita *T. cruzi* e apresentam **sequelas clínicas**, que podem não gerar sintomas, mas serem fatais, como inflamação do **miocárdio** e em regiões do cérebro.

Recomenda-se tratamento medicamentoso durante a fase inicial da infecção (primeiros 6 meses). Neste período a resistência da pessoa infectada é maior e a associação de uma resposta imunológica eficiente, incluindo células sanguíneas denominadas monócitos, eosinófilos e neutrófilos, com o tratamento medicamentoso poderá promover um total controle da multiplicação deste parasita no hospedeiro. No entanto, o parasita *T. cruzi* desenvolveu mecanismos para escapar

da resposta imune e persistir no organismo. Sendo assim, passados os seis primeiros meses, a queda na eficiência da resposta imune na ausência de medicação específica geralmente resulta em lesões dos órgãos infectados.

Dentre as células do sistema imune, os neutrófilos são as primeiras a chegarem ao local de uma inflamação. Além do mecanismo mais conhecido de defesa dos neutrófilos, a **fagocitose**, foi descoberto recentemente que os neutrófilos são capazes de liberar seu DNA em resposta a um estímulo infeccioso, formando estruturas que são chamadas NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos) (Figura 1). Estas estruturas são capazes de capturar e matar diversos patógenos, contribuindo na eliminação destes pelo **hospedeiro**.

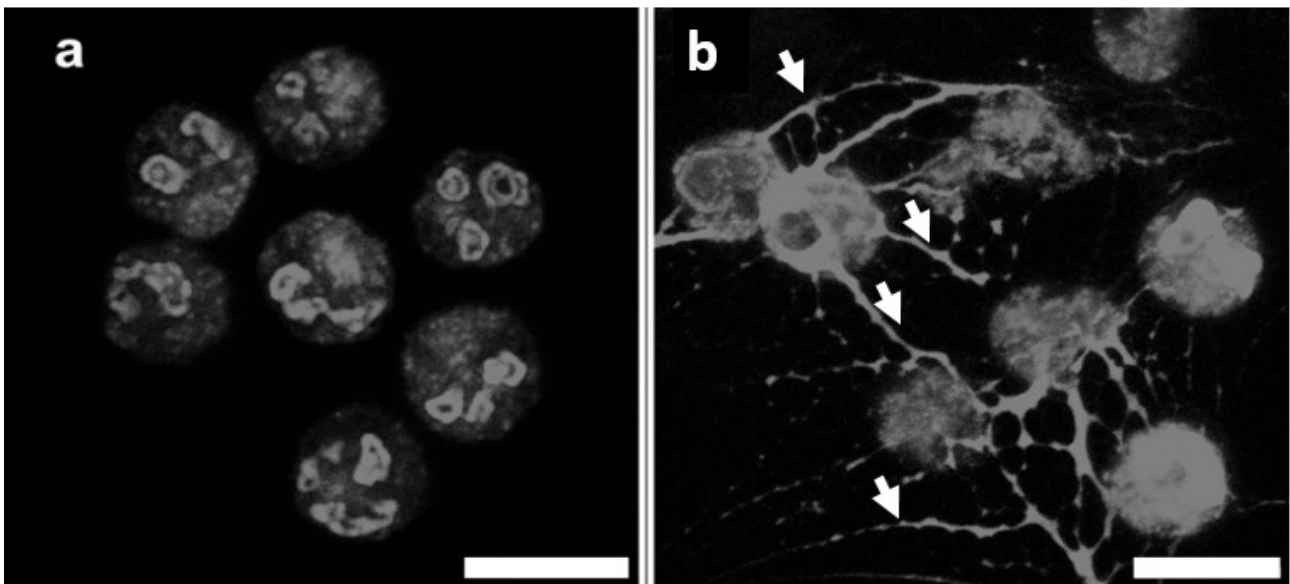


Figura 1. Neutrófilos ativados demonstrando a formação e liberação de NETs. (a) neutrófilos não ativados e com DNA intracelular; (b) neutrófilos ativados e com DNA extracelular como evidenciado pelas setas brancas. Fonte: modificado de Fuchs *et al.* (2007). Escalas: 10 μ m.

O processo que libera estas estruturas é denominado NETose, e ainda é alvo de diversos estudos, sendo definido por apresentar características distintas daquelas apresentadas pelos processos comuns de morte celular, a apoptose e a necrose.

A característica principal de morte celular pelo processo de apoptose é a degradação do DNA intracelular e a exposição de uma molécula chamada fosfatidilserina na membrana externa da célula apoptótica. A exposição de fosfatidilserina sinaliza para o sistema imune que esta célula deve ser fagocitada e eliminada, pois se encontra em processo de morte celular. Na morte celular por necrose a principal característica é o aumento da **permeabilidade** da membrana da célula. Este fato desestabiliza o equilíbrio osmótico da célula resultando em morte por rompimento da membrana celular.

Pensando neste novo processo capaz de capturar e matar patógenos e nos protozoários causadores da Doença de Chagas, diversos testes foram realizados pelo nosso grupo de estudos na Unesp - Assis para verificar: 1) se o parasita *T. cruzi* seria capaz de estimular a geração das NETs; e, 2) se o processo de NETose induzido pelo parasita ocorreria na presença de morte celular programada ou necrose. Nestes testes foi verificada se há a presença de características dos outros processos comuns (apoptose e necrose) para demonstrar também se o processo de NETose é realmente distinto.

Durante os experimentos, os neutrófilos isolados de amostras de sangue humano de doadores voluntários foram colocados em contato com os parasitas *T. cruzi* (isolados de camundongos infectados) em diferentes períodos de tempo (1 a 4 horas). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências e Letras de Assis (protocolo 02073912.0.0000.5401) e do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (protocolo 262/2012).

Após estes diferentes períodos de tempo foram realizados testes de microscopia de fluorescência para visualização do DNA intra e extracelular. A viabilidade celular foi investigada através de ensaios de taxa metabólica (adição de MTT), degradação do DNA (eletroforese em gel de agarose) e permeabilidade da membrana celular (citometria de fluxo).

Podemos observar na Figura 2 que, em contato com o parasita *T. cruzi*, os neutrófilos foram estimulados a extravasarem seu DNA para o meio extracelular. Análises microscópicas mais

detalhadas demonstraram haver parasitas capturados em toda a extensão das NETs. Além disso, as análises de viabilidade celular demonstraram que neutrófilos incubados com o parasita *T. cruzi* não apresentam sinais de degradação de DNA, nem exposição da molécula fosfatidilserina e nem alteração da permeabilidade celular.

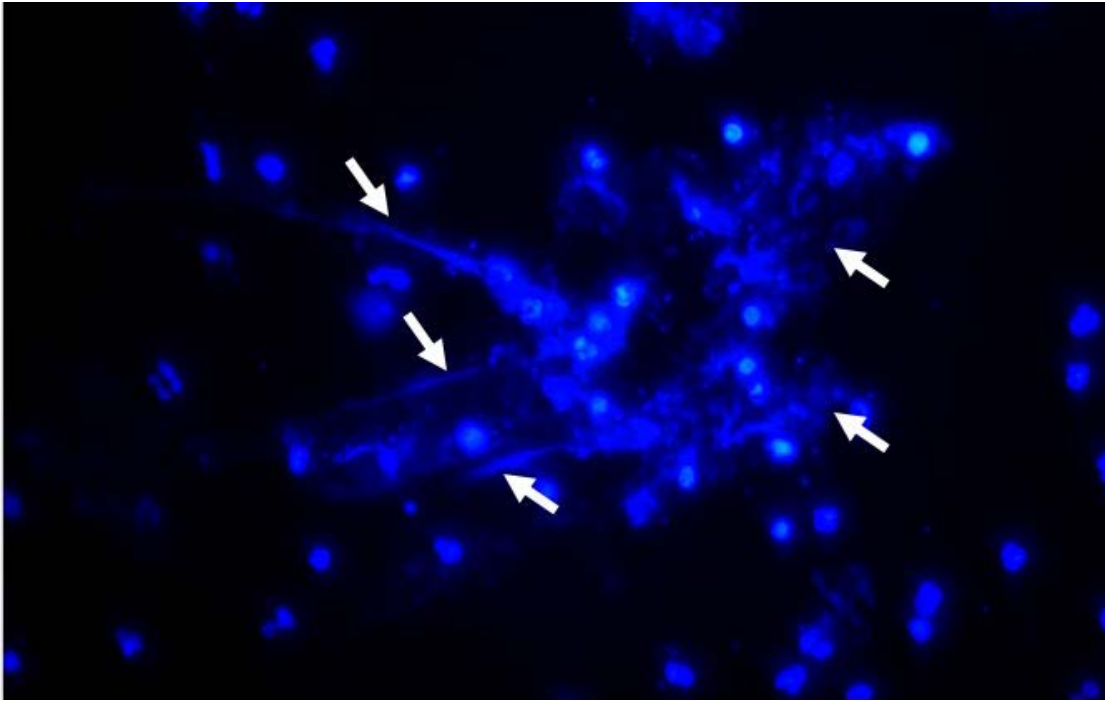


Figura 2. Neutrófilos humanos co-incubados com o parasita *T. cruzi* apresentam liberação de NETs (indicadas pela seta branca). A coloração azul se dá em virtude de um corante específico para DNA chamado DAPI. Aumento de 400x.

Com este conjunto de resultados, nosso grupo demonstrou pela primeira vez que o parasita *T. cruzi* é capaz de estimular a geração das NETs. Reafirmamos ainda que a NETose se apresenta como um processo distinto de apoptose e necrose. A continuação destes estudos, conhecendo melhor as distinções do processo de NETose, pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias que possam estimular o sistema imunológico de forma eficiente e assim melhorar o controle da infecção por *T. cruzi* e sua **patogenia**. O estímulo controlado das NETs poderá ajudar na captura e eliminação dos parasitas, de forma que o sistema imune não cause tantas lesões ao

organismo nas tentativas de eliminação do patógeno, que tem se mostrado resistente aos seus mecanismos atuais e aos tratamentos existentes.

Glossário:

Parasita – organismo que vive em associação com outro organismo, retirando deste, meios para sua sobrevivência;

Sequelas clínicas – alteração da anatomia ou função do corpo, sendo causada por uma doença ou um acidente;

Miocárdio – músculo do coração;

Fagocitose – englobamento e digestão de partículas sólidas e microrganismos por uma célula;

Hospedeiro – é um organismo que abriga outro, ou seja, o organismo que abriga o parasita;

Permeabilidade – propriedade da membrana celular que permite a passagem de substâncias do meio externo para o meio celular ou vice-versa;

Patogenia – modo como a doença age no organismo, sequência de características da doença causadas pelo patógeno.

Referências bibliográficas:

Brinkmann, V.; Zychlinsky, A. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs.

Nature Reviews Microbiology, 5: 577-582.

Diniz, L.F.A. 2013. **O processo de Netose induzido por antígenos solúveis do parasita *Trypanosoma cruzi* ocorre na ausência de apoptose e necrose.** Trabalho de Graduação (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Letras, UNESP, Assis.

Fuchs, T.A.; Abed, U.; Goosmann, C.; Hurwitz, R.; Schulze, I.; Wahn, V.; Weinrauch, Y.; Brinkmann, V.; Zychlinsky, A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **The Journal of Cell Biology**, 176: 231-241.

Rocha, D.S. 2013. ***Trypanosoma cruzi* estimula a liberação das NETs de maneira dose- e tempo-dependente em neutrófilos humanos.** Trabalho de Graduação (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Letras, UNESP, Assis.

Souza, P.S.S. 2013. **Análise da presença de sinais apoptóticos, necróticos e/ou netose durante a incubação de neutrófilos humanos com o parasita *Trypanosoma cruzi*.** Trabalho de Graduação (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Letras, UNESP, Assis.

Tobias, M.T. 2013. **Moléculas solúveis do parasita *Trypanosoma cruzi* induzem a formação e liberação das NETs.** Trabalho de Graduação (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Letras, UNESP, Assis.