

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



THIAGO MIRANDA DA SILVA

"FUNCIONALIDADE DO COMPLEXO I DA CADEIA
RESPIRATÓRIA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*"

Este trabalho encontra-se à redação final
da tese defendida para a obtenção do
Thiago Miranda da Silva
Fernanda Ramos Gadelha
e aprovada pelo Conselho Julgador

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Campinas, 2010

RCHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38f Silva, Thiago Miranda da
Funcionalidade do complexo I da cadeia respiratória de
Trypanosoma cruzi/ Thiago Miranda da Silva. – Campinas,
SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Fernanda Ramos Gadelha.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Bioenergética. 3.
Transporte de elétrons. I. Gadelha, Fernanda Ramos. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: *Trypanosoma cruzi* respiratory chain complex I functionality.

Palavras-chave em inglês: *Trypanosoma cruzi*; Bionergetics; Electron transport.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Fernanda Ramos Gadelha, Giovanna Rosa Degasperl, Cláudio Chrysostomo Wernick.

Data da defesa: 15/03/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 15 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Giovanna Rosa Degasperi


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Wernick


Assinatura

Profa. Dra. Maristela Cesquini Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Assinatura

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de vida e sabedoria. A Ele a glória. Hoje e sempre.

A meu pai, José, e minha mãe, Maria Neusa por acreditarem que a educação é a base de um mundo melhor e que mesmo com todas as dificuldades não mediram esforços para verem minhas vitórias.

Aos meus irmãos, Douglas e Patrícia sempre juntos caminhando rumo ao conhecimento. Deus os ilumine sempre. Vocês são o meu exemplo.

À Profa. Fernanda Gadelha, pela sua paciência, carinho, atenção e prestatividade sempre, além de exemplo de responsabilidade e profissionalismo; sempre disposta a ouvir, dar conselhos e auxiliar nos experimentos e escritas. Uma pessoa que sempre levarei no coração.

Aos professores que me auxiliaram no desenvolvimento da tese... Obrigado.

Ao meu amigo Eduardo Peloso, fundamental para a concretização deste trabalho. Mais que um irmão, um exemplo de caráter e de impressionante profissionalismo, que por mais de 4 anos dividi quase todos os momentos. Deus permita que você continue a transmitir conhecimento, solidariedade e diversão (claro!) para quem estiver à sua volta.

Ao pessoal do LabBDAT e laboratórios adjacentes que acompanharam esta jornada: Laurinha, Thysa, Débora, Simone Tucci, Pablo, Matheus, Mariana e Conrado.

Ao irmão Kiko que tanto me ajudou, ouviu e ainda brincou comigo nesse tempo. Além de ser o responsável por encher a minha mochila de materiais recicláveis. Ainda devolvarei todas as brincadeiras que fizeste comigo!!!

À minha amiga Simone Vitor, a Simonezinha, que me acompanhava sempre no RA e formamos com o Kiko o “SUPERGRUPO A” do LABDAT... Sempre no meu coração!!

A todos os meus amigos, seja de Alfenas, Campinas, São Paulo ou tantos outros lugares pelo Brasil. Levarei a amizade de vocês para sempre.

Aos professores da banca de qualificação, pelas valiosas sugestões e contribuições.

À CAPES pela bolsa concedida.

À UNICAMP pela estrutura e pela oportunidade.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

LISTA DE ABREVIATURAS

DC – Doença de Chagas

L – prolina – *Levogiro* prolina

CR – Controle respiratório

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH-FRD – Fumarato redutase dependente de NADH

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

FADH₂ – Dihidro-flavina adenina dinucleotídeo (forma reuzida)

ATPase – ATP sintase

Olg - Oligomicina

EGTA – Ácido tetraacético etilenoglicol

KCN – Cianeto de potássio

AA – Antimicina A

SDH – Succinato desidrogenase

$\Delta\Psi$ - Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	1
1.1.1. Aspectos gerais e Doença de Chagas.....	1
1.1.2. Cadeia respiratória do <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	4
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Geral.....	10
2.1. Objetivos específicos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Cultura de células.....	11
3.2. Consumo de oxigênio.....	11
3.3. Dosagem enzimática da succinato desidrogenase.....	11
3.4. Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$).....	12
3.5. Análise estatística.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5. CONCLUSÕES.....	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas (DC), cujo tratamento é feito através do uso do nifurtimox e benzonidazol. Esses medicamentos não são efetivos tornando a busca para novos alvos para o desenvolvimento de uma terapia mais específica uma prioridade. O alto grau de heterogeneidade existente entre as cepas representa um desafio para o desenvolvimento desta terapia, tornando a compreensão da biologia do parasita essencial nessa busca. O objetivo deste trabalho foi avaliar a funcionalidade do complexo I da cadeia respiratória de epimastigotas de *T. cruzi* ao longo da curva de proliferação (fases *log*, estacionária e estacionária tardia). Deste modo foi avaliado em duas cepas (Tulahuen 2 e Y) o consumo de oxigênio, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) e a atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH), utilizando-se diferentes substratos respiratórios (malato/piruvato (M/P) malato/piruvato + malonato (MPM) ou succinato (SUC)). De um modo geral, em ambas as cepas o consumo de oxigênio foi maior na fase estacionária tardia em relação à *log*. A utilização de diferentes substratos não resultou em diferenças significativas nas taxas de respiração em ambas as cepas. Tulahuen 2 exibiu maiores taxas de consumo de oxigênio em relação à Y. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de controle respiratório ($\sim 1,7$) nas duas cepas, nas diferentes fases de proliferação. Na presença de um desacoplador da fosforilação oxidativa, as taxas não variaram na cepa Y, enquanto na Tulahuen 2 ocorreu um aumento em direção à fase estacionária tardia. A administração de malonato, inibidor competitivo da SDH, rendeu padrões diferenciados de inibição com a respiração sustentada por diferentes substratos que não variaram quando as células foram submetidas a um “jejum” (incubadas em PBS / 1 mM MgCl₂) por 3 horas. A atividade da SDH diminuiu em ambas as cepas na fase estacionária em relação à *log*, justificando a queda das taxas de inibição pelo malonato. Não foram registradas diferenças significativas com o aumento da concentração deste inibidor. A adição de cianeto de potássio não inibiu completamente a respiração, não importando o substrato utilizado ou a fase de proliferação, indicando que outras fontes além da cadeia respiratória estão consumindo oxigênio. Interessantemente, o $\Delta\Psi$ não variou entre as cepas em nenhuma fase de proliferação. Estes resultados fornecem novos dados sobre a cadeia respiratória do parasita, além de indicarem que não foi possível estabelecer a funcionalidade do complexo I, uma vez que o malonato não é um inibidor eficiente do complexo II.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas' disease, where nifurtimox and benznidazole are used in treatment. These drugs are not efficient turning the search for new targets to be used in the development of a more effective therapy a priority. The high degree of heterogeneity among strains represents a challenge for the development of this therapy, and the comprehension of the parasite biology becomes essential in this search. The aim of this work was to evaluate the functionality of the respiratory chain complex I along the growth curve in *T. cruzi* epimastigotes. In this way it was analyzed in two strains (Tulahuen 2 and Y) the oxygen consumption, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) and succinate dehydrogenase (SDH) activity, using different respiratory chain substrates (Malate/Pyruvate, Malate/Pyruvate + Malonate or Succinate). Generally, in both strains oxygen consumption was higher in the late stationary phase in relation to the *log* phase. The use of different substrates for the respiratory chain did not lead to significant variations in the respiratory rates in both strains. Tulahuen 2 showed higher oxygen consumption rates than the Y strain. No significant differences were observed in the respiratory control rates ($\sim 1,7$) in both strains along the growth curve. In the presence of an uncoupler, the respiration rates did not vary in the Y strain while in Tulahuen 2 an increase towards the late stationary phase was observed. Addition of malonate, a SDH competitive inhibitor, resulted in distinct inhibition patterns when respiration was sustained by different substrates and did not change when cells were "starved" (incubated in PBS / 1 mM MgCl_2) for 3 hours. SDH activity decreased in both strains in the stationary phase in relation to *log* phase that could explain the decrease in the inhibition rates induced by malonate. No significant differences were observed with higher inhibitor concentration. Addition of potassium cyanide did not completely inhibit respiration in both strains regardless the substrate or growth phase, suggesting that other sources beyond the respiratory chain consume oxygen. Interestingly, $\Delta\Psi$ were similar between strains in all growth phases. These results provide new data about the parasite's respiratory chain indicating that complex I functionality was not possible to determine, once malonate is not a good inhibitor of complex II.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

1.1.1 Aspectos gerais e Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é o agente etiológico da Doença de Chagas (DC), conhecida também como tripanossomíase americana. O parasita pertence ao Reino Protozoa, Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastidae, Família Trypanosomatidae e Gênero *Trypanosoma*. Cerca de 16 a 18 milhões de pessoas são acometidas pela doença no continente americano (WHO, 2007) e aproximadamente 120 milhões estão em áreas de risco (DUTRA et al., 2006). Essa doença é um problema de saúde pública na América Latina, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (DIAS E COURA, 1997; Dutra et al., 2006; WHO, 2007).

A infecção humana dependeu basicamente da aproximação do homem com insetos da ordem dos triatomíneos, os vetores da DC. Este processo corresponde à domiciliação destes vetores a partir do século XVI, dando início a um ciclo denominado doméstico, atingindo um pico de endemicidade na primeira metade do século XX (DIAS E COURA, 1997). As principais espécies de vetores triatomíneos descritos em humanos são *Triatoma infestans*, *T. sordida* e *T. pseudomaculata* nos países da América do Sul e *Rhodnius prolixus* em países da América Central e do Norte (FORATTINI, 1980).

No ciclo de vida heteroxeno (que envolve mais de um hospedeiro) do *T. cruzi*, quatro estágios morfológicos são descritos (tripomastigotas metacíclicos, amastigotas, tripomastigotas sanguíneos e epimastigotas) (TYLER & ENGMAN, 2001) (Figura 1). Quando o triatomíneo alimenta-se do sangue infectado do hospedeiro vertebrado, formas tripomastigotas sanguíneas são sugadas (Figura 1-5). Estas diferenciam-se no inseto em epimastigotas que aderem-se às membranas perimicroviliares das células intestinais (Figura 1-6) e multiplicam-se por divisão binária (Figura 1-7). Essas formas transformam-se no intestino posterior do inseto, em formas infectantes e não-proliferativas denominadas tripomastigotas metacíclicos (Figura 1-8) (BONALDO et al., 1988; TYLER & ENGMAN, 2001), que após se desligarem das paredes intestinais acumulam-se na parede retal do vetor (Figura 1-1). O triatomíneo contaminado, ao picar um novo hospedeiro não-infectado, defeca próximo ao local da picada, liberando as formas contaminantes. Ao coçar a região da picada, os parasitas são transferidos mecanicamente com as fezes do vetor para a região da ferida e adentram no hospedeiro vertebrado. Os parasitas invadem as células nucleadas (Figura 1-2) com o recrutamento de lisossomos da célula do hospedeiro. Estes envolvem o parasita em um

vacúolo, denominado fagolisossomo (BURLEIGH & ANDREWS, 1995), com função de digeri-lo. Porém, algumas formas tripomastigotas conseguem escapar para o citosol, diferenciando-se em amastigotas intracelulares (Figura 1-3). Os amastigotas se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos que são liberados pela célula infectada no sangue (Figura 1-4) disseminando a infecção pelo organismo.

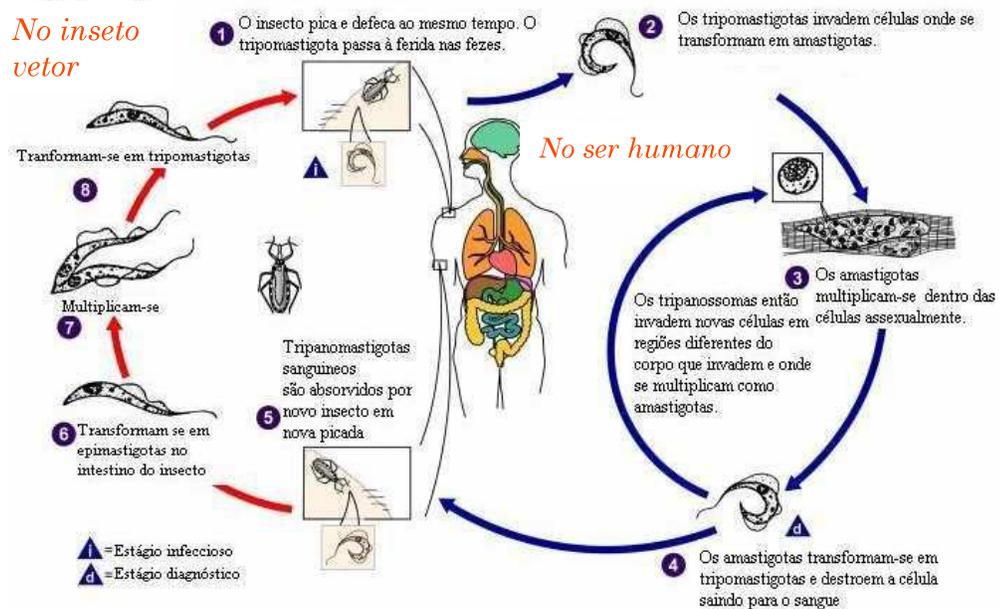


Figura 1: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado (setas azuis) e invertebrado (setas vermelhas). Adaptado de <http://www.limeirajovem.com.br/home/artigos-a-dicas/288-doenca-de-chagas.html>.

Apesar da DC ter sido descoberta em 1909 somente em meados da década de 80 um processo sistematizado de controle vetorial do *T. infestans* foi instituído pelo Governo Federal (MOREL, 1999). Este programa rendeu ao Brasil no ano de 2006 o certificado da eliminação da transmissão vetorial pelo *T. infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde (FERREIRA & TABOSA E SILVA, 2006). Apesar da eliminação da transmissão pelo principal vetor, é importante lembrar que as outras espécies de vetores continuam ativas na transmissão da doença no país (*Prolixus megistus* e *Triatoma brasiliensis*, em especial) (DIAS, 2006).

Com a diminuição dos casos de transmissão vetorial, outras formas de transmissão tomaram destaque, como a oral, que ocorre pela ingestão de alimentos contendo triatomíneos ou suas dejeções ou geralmente com alimentos *in natura*. Neste caso merecem destaque no

Brasil casos de surtos da doença associada à ingestão de caldo de cana (Santa Catarina, 2005) e açaí (Pará, 2006; Amazonas, 2007). No período de 2005 a 2007, foram relatados ao Ministério da Saúde um total de 170 casos e 10 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A transmissão via transfusional, descrita pela primeira vez em 1952 (DIAS, 1986) tornou-se a mais importante em países não-endêmicos, como Espanha e Canadá (BRENER et al., 2000). (COURA, 1997; BENCHIMOL BARBOSA, 2006). Outras vias de transmissão ainda são descritas, como acidentes laboratoriais, compartilhamento de seringas, transplantes de órgãos (BARCAN et al., 2005) e via congênita ou vertical (mãe para feto), que pode ocorrer via transplacentária ou durante o parto (FRAGATA FILHO et al., 2008).

O tratamento da DC atualmente se concentra na administração de duas drogas, o nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)-tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido), comercializado pela Bayer® com o nome de Lampit® (não utilizado no Brasil), e o benzonidazol (N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida) comercializado com o nome de Rochagan® no Brasil. Resultados positivos foram alcançados apenas em pacientes com a doença na fase aguda. Porém, severos efeitos colaterais são relatados com a administração destes medicamentos, como náuseas, anorexia, perda de peso, distúrbios gastrintestinais, entre outros (DIAS e COURA, 1997). O mecanismo de toxicidade destes compostos parece ser mediado pela formação de metabólitos eletrofilicos oriundos da redução cíclica dos grupamentos nitro por enzimas denominadas nitroreduases. Estes metabólitos conjugam-se à tripanotiona e/ou glutaciona, importantes antioxidantes do parasita (MAYA et al., 1997), tornando-o mais suscetível ao estresse oxidativo.

O grande desafio para o tratamento da DC é a imensa variabilidade genética existente entre as cepas do *T. cruzi* (MACEDO et al., 2001). Estudos demonstraram evidências de trocas genéticas entre grupos da espécie. Em 1998, Fernandes e colaboradores separaram 86 amostras de várias cepas de *T. cruzi* provenientes de diferentes regiões do Brasil e por análises de sequências de DNA que codificam o RNA ribossomal 24S separaram as cepas em dois principais grupos, I e II. As cepas do grupo I foram relacionadas ao ciclo doméstico e as do grupo II ao ciclo silvestre (estes isolados dos pacientes que provinham da região amazônica). Foi demonstrado que o processo de domiciliação amazônica teria atraído hospedeiros intermediários a estas regiões (ZINGALES et al., 1999) e mais tarde propôs-se a separação do grupo *T. cruzi* II em cinco subgrupos, denominados IIa – IIe (STURM et al., 2003). Novos estudos demonstraram evidências de recombinações genéticas entre os grupos de *T. cruzi* (SPOTORNO et al., 2008) e outras análises chegaram a levantar a hipótese dos subgrupos I e II serem de espécies diferentes (TOMAZI et al., 2009).

Essa diferença na genética do *T. cruzi* pode refletir nas variações observadas na resposta ao tratamento com benzonidazol, nas curvas e taxas de proliferação e na resistência ao estresse oxidativo de formas epimastigotas (DUTRA et al., 2006; IGOILLO-ESTEVE & CAZZULO, 2006; MIELNICZKI-PEREIRA et al., 2007), assim como na atividade de fosfatases (MORALES et al., 2009). Tais dados reforçam a heterogeneidade da população de *T. cruzi* e ressaltam o grande desafio para o desenvolvimento de um tratamento eficaz contra a doença.

Diante da toxicidade observada no uso desses medicamentos, a busca por uma terapia mais efetiva se faz necessário. Algumas vias bioquímicas merecem destaque, como a síntese de ergosterol, o principal esterol presente nas membranas celulares do *T. cruzi*, que é diferente da via de produção do colesterol nos mamíferos. Outros alvos direcionam-se às enzimas da via glicolítica, síntese de DNA e sistema antioxidante, sendo que este último atualmente está na vanguarda da pesquisa para novas drogas (PIÑERO et al., 2008; PIACENZA et al., 2008; PIACENZA et al., 2009).

Por apresentar apenas uma mitocôndria, os mecanismos de obtenção de energia nesse parasita também foram apontados como alvos em potencial para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias. Nesse sentido a obtenção de dados sobre o mecanismo e a significância fisiológica das reações envolvidas na obtenção de energia torna-se relevante.

1.1.2 Cadeia respiratória do *Trypanosoma cruzi*

Os tripanossomatídeos dependem de fontes disponíveis de carbono dos hospedeiros para a manutenção do metabolismo energético, mantendo durante todo o ciclo de vida uma glicólise ativa (CAZZULO, 1992). Apesar das formas epimastigotas viverem em um ambiente onde a disponibilidade maior de substratos provém de aminoácidos, principalmente *L*-prolina, e esta ser a sua principal fonte de energia, o parasita utiliza a glicose como fonte primária de carbono em meio com disponibilidade desta molécula. As formas amastigota e tripomastigota também utilizam preferencialmente a glicose como fonte de carbono, uma vez que é encontrada em abundância nos fluidos corporais do hospedeiro vertebrado (BRINGAUD et al., 2006) (Tabela 1).

Tabela 1: Produtos finais do metabolismo das fontes de carbono pelo *Trypanosoma cruzi* cultivados em meios ricos em glicose (adaptado de BRINGAUD et al., 2006).

Estágio evolutivo	Hospedeiro	Fontes de carbono	Produtos excretados em condições ricas em glicose
Tripomastigota	Vertebrado	Glicose	CO ₂ , succinato, acetato
Amastigota	Vertebrado	Glicose	CO ₂ , succinato, acetato, glicerol e piruvato
Epimastigota	Inseto	Glicose Aminoácidos	CO ₂ , succinato, acetato, L-alanina Não determinado

A característica marcante do metabolismo dos tripanossomatídeos é a excreção de metabólitos não completamente oxidados pela cadeia respiratória, como visto na Tabela 1 (BRINGAUD et al., 2006). As causas desta característica metabólica dos tripanossomatídeos, que diferencia da via dos mamíferos, ainda não estão claras, porém acredita-se que isso ocorre quando há excesso de equivalentes reduzidos na célula, ultrapassando a capacidade da cadeia respiratória (BRINGAUD et al., 2006).

O *T. cruzi* mantém uma cadeia respiratória ativa durante todas as fases do ciclo de vida, e a produção de energia por esta via é comprovadamente essencial para a sua sobrevivência (STOPPANI et al., 1980). Existem várias diferenças entre a estrutura da cadeia respiratória dos tripanossomatídeos e a dos mamíferos, variando ainda, no caso de *Trypanosoma brucei*, entre os estágios de desenvolvimento, desde uma cadeia respiratória não-funcional em formas tripomastigotas sanguíneas até uma cadeia completamente ativa em formas presentes em insetos (OPPERDOES & MICHELS, 2008). Em geral existe uma cadeia de transporte de elétrons ativa na qual vários complexos enzimáticos transferem os equivalentes reduzidos aos complexos ubiquinol/ubiquinona, que transportam os elétrons para as oxidases terminais (TIELENS & VAN HELLENMOND, 1998), reduzindo o O₂ (acceptor final de elétrons) a H₂O (Figura 2).

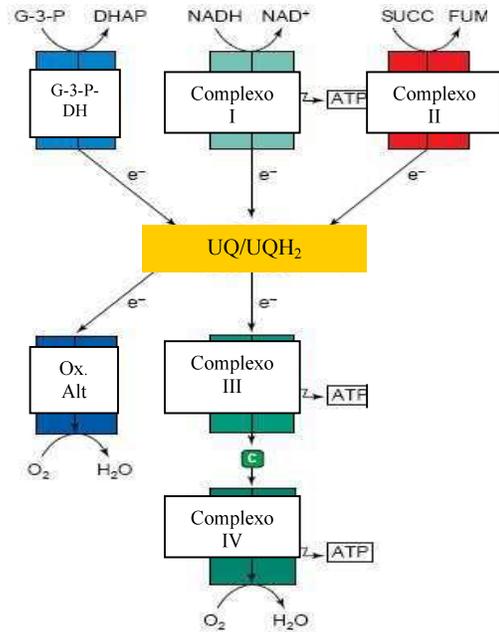


Figura 2: Esquema da cadeia de transporte de elétrons dos tripanossomatídeos e mamíferos. NADH desidrogenase (complexo I) e os complexos II, III e IV da cadeia respiratória dos mamíferos são mostrados em verde. A enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (G-3-P DH) e a oxidase alternativa (Ox. Alt.), presentes em *T. brucei*, são mostrados em azul. G-3-P: gliceraldeído-3-fosfato; DHAP: dihidroxiacetona-fosfato; FUM: fumarato; SUCC: succinato; c: citocromo c; UQ: ubiquinona; UQH₂: ubiquinol (adaptado de Tielens & Van Hellemond, 1998).

Em mamíferos o complexo I da cadeia respiratória (NADH desidrogenase, também chamado NADH: quinona oxidoreductase) está localizado na membrana mitocondrial interna e catalisa a transferência dos elétrons do NADH para a coenzima Q (ou ubiquinona) (Figura 2), e a transferência de elétrons é simultânea à extrusão de prótons para o espaço intermembrana mitocondrial, gerando um gradiente de prótons transmembrana usado para a síntese de ATP ou transporte de solutos.

O complexo I em mamíferos tem uma massa aproximada de 1000 kDa e aproximadamente 46 subunidades (GABALDÓN et al., 2005; OPPERDOES & MICHELS, 2008) o que torna esta proteína o maior complexo protéico transmembrana conhecido.

Em relação aos tripanossomatídeos, em *T. brucei* foi constatado que o complexo I possui apenas 19 subunidades e uma massa estimada de 660 kDa (OPPERDOES & MICHELS, 2008). Apesar de apresentar todas as subunidades responsáveis pelo transporte de elétrons, quatro subunidades envolvidas na translocação de prótons para o espaço intermembrana mitocondrial e que são codificadas por genes mitocondriais estão ausentes (OPPERDOES & MICHELS, 2008; CARRANZA et al., 2009) (Figura 3). Assim, acredita-se que este complexo não está envolvido na transdução de energia e que sua principal função seja a regeneração do NAD⁺ mitocondrial (OPPERDOES & MICHELS, 2008).

Uma questão importante se abre neste contexto: se o complexo I nos tripanossomatídeos não está envolvido na produção de ATP, qual seria a sua função? Uma das hipóteses levantadas seria a sua participação na formação de supercomplexos respiratórios, que permitiriam a transferência de elétrons mais eficientemente. O complexo pode estar servindo, portanto, de arcabouço para sustentação dos outros complexos, fazendo com que estes assumam uma conformação que torne mais eficiente a transferência de elétrons entre os complexos (CARRANZA et al., 2009).

O complexo II da cadeia respiratória (também conhecido como succinato: ubiquinona redutase ou succinato desidrogenase) transfere os equivalentes reduzidos da reação da succinato desidrogenase diretamente a quinona da cadeia respiratória. O complexo II de *T. cruzi* possui doze subunidades e cerca de 550 kDa, sendo quase quatro vezes maior que a enzima bovina ou a de levedura (aproximadamente 150 kDa) (MORALES et al., 2002).

O succinato é uma molécula central no metabolismo do *T. cruzi*, sendo produzido no glicossoma e na mitocôndria. Acreditava-se que a produção do succinato na mitocôndria seria mediada pela reação inversa da succinato desidrogenase, mas Christmas e Turrens (2000) demonstraram que em *T. cruzi* a produção do succinato mitocondrial ocorre por uma fumarato redutase dependente de NADH (NADH-FRD). O modelo da produção de succinato mitocondrial pelos tripanossomatídeos provém através de estudos com tripomastigotas metacíclicos (formas presentes em inseto) de *T. brucei*: o piruvato produzido pela glicólise é convertido em malato, que entra na mitocôndria e é convertido em succinato pela NADH-FRD mitocondrial, sendo excretado do parasita em situações de excesso de equivalentes reduzidos produzidos pela célula (BRINGAUD et al., 2006). Assim, através de estudos realizados em *T. brucei*, diz-se que a cadeia respiratória do *T. cruzi* está adaptada ao succinato como aceptor final de elétrons. Outra molécula que desempenha esta função é o acetato, porém não há muitos estudos a esse respeito (BRINGAUD et al., 2006).

O complexo III (ou complexo citocromo bc_1) recebe os elétrons do *pool* de ubiquinona e os transfere para o citocromo *c* (Figura 2). Em mamíferos, este complexo possui 11 subunidades (CECCHINI, 2003). Em estudos realizados com epimastigotas de *T. cruzi*, o complexo é inibido por antimicina A (AA) assim como em mamíferos (DE BOISO et al., 1979). Porém, nos tripanossomatídeos pouco se sabe sobre a sua estrutura ou seu funcionamento.

O complexo IV (ou citocromo *c* oxidase) dos tripanossomatídeos também difere do de mamíferos. Em *Leishmania tarentolae*, os genes que codificam este complexo são codificados no núcleo e não possuem homologia com os de mamíferos. Já em *T. cruzi* há

homologia com os genes de *L. tarentolae* (MASLOV et al., 2002), porém não há estudos sobre a caracterização deste complexo. Os epimastigotas de *T. cruzi* e os promastigotas de *T. brucei*, além das formas promastigotas de *Leishmania* sp, possuem uma cadeia respiratória contendo o citocromo sensível ao cianeto ligado à fosforilação oxidativa (CHAUMONT et al., 1994).

Uma característica de alguns tripanossomatídeos é a presença de oxidases alternativas terminais em adição ao complexo IV, como no caso de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. brucei* (Figura 2). A glicerol 3-fosfato desidrogenase (presente no glicossomo) doa os equivalentes reduzidos via NADH para a glicerol 3-fosfato desidrogenase mitocondrial (contendo o grupamento prostético FAD), que transfere estes equivalentes para a ubiquinona/ubiquinol e desta para a oxidase alternativa (Figura 2). Esta oxidase é inibida pelo ácido salicilhidroxâmico (SHAM) (NJOGU et al., 1980) e a atividade não está ligada à produção de ATP (TIELENS & VAN HELLENMOND, 1998). Em *T. cruzi*, não há evidências de atividade de oxidase alternativa (CHAUDHURI et al., 2006).

A falta de informações acerca do metabolismo do *T. cruzi*, aliado ao fato de os poucos dados levantados sobre a espécie indicarem diferenças importantes em relação aos mamíferos, reforça a importância do aprofundamento no conhecimento sobre a bioenergética mitocondrial do parasita. Deste modo, estes dados podem servir de base para a identificação de alvos terapêuticos que sejam mais específicos e eficientes no combate a esta doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar a bioenergética mitocondrial em duas cepas, Tulahuen 2 (linhagem I) e Y (linhagem II), visando a determinação da funcionalidade do complexo I.

2.2 Objetivos específicos:

Avaliar ao longo da curva de proliferação, utilizando diferentes substratos: malato/piruvato (M/P) (complexo I + II), malato/piruvato + malonato (M/P/M) (complexo I) e succinato (S) (complexo II), os seguintes parâmetros:

- a) Taxas de consumo de oxigênio, controle respiratório e velocidade máxima da cadeia respiratória,
- b) Efeito de diferentes concentrações de malonato no consumo de O_2 ,
- c) Atividade da succinato desidrogenase,
- d) Efeito do cianeto no consumo de O_2 e
- e) Potencial de membrana mitocondrial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Epimastigotas de *T. cruzi*, cepas Tulahuen 2 e Y, inoculados a $5,2 \times 10^6$ células/ mL foram crescidos a 28°C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) com 20 µg/mL de hemina e 10% de soro fetal bovino inativado. Após 3, 5 e 7 dias de proliferação (*log*, fase estacionária e estacionária tardia, respectivamente), as células foram centrifugadas (2500 rpm, 4°C), lavadas com tampão fosfato salino (PBS), pH 7,3 e ressuspensas em meio apropriado para o desenvolvimento de cada experimento. O número de células foi determinado em câmara de Neubauer.

3.2 Consumo de oxigênio:

As células (1×10^8 /mL) foram incubadas em meio de reação padrão (125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 2 mM de KH_2PO_4 , 0,5 mM de MgCl_2 , 10 mM de HEPES, pH 7,2, 1 mM de EGTA e 1 mg/mL de albumina de soro bovina (BSA)) na presença de 50 µM de digitonina e os substratos da cadeia respiratória: 5 mM de malato/ 5 mM de piruvato (MP) ou 5 mM de malato/ 5 mM de piruvato/ 10 mM de malonato (MPM) ou 5 mM de succinato (SUC). O consumo de oxigênio foi determinado em um oxígrafo *Clark-type* (Hanstech® Systems, Yellow Springs Co.) numa câmara com temperatura controlada (28°C) e sob agitação constante. O controle respiratório (CR), i. e. Estado3 / Estado 4, foi determinado após adição de 400 µM de adenosina difosfato (ADP) (Estado 3) e 2 µg/mL de oligomicina (Olg) (Estado 4). A velocidade máxima da cadeia respiratória foi determinada após a adição de 1 µM de carbonil-cianeto-clorofenilidrazona (CCCP).

Os testes de inibição da cadeia respiratória foram feitos adicionando-se 10 mM de malonato após a respiração basal sustentada por MP ou SUC e adicionando-se 2 mM de cianeto de potássio (KCN) diretamente após a respiração basal sustentada pelos substratos MP ou SUC. As células foram ainda mantidas por 3 horas em meio PBS/1 mM MgCl_2 , onde os mesmos parâmetros de inibição foram testados.

3.3 Dosagem enzimática da succinato desidrogenase

O ensaio foi baseado na redução da fenazina metassulfato (PMS) pela enzima succinato desidrogenase (SDH) (SINGER et al., 1974). O PMS reduzido é prontamente reoxidado pelo composto 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) e a diminuição da absorbância foi acompanhada em um espectrofotômetro (Beckman) a 600 nm. As células (1×10^7 /mL)

foram incubadas em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,2 na presença de 0,05% de Triton X-100 (Sigma), 1 mM de succinato, 1 μ M de AA, 1 mM de PMS e 80 μ M de DCIP (MIRANDOLA et al., 2008).

3.4 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

O $\Delta\Psi$ mitocondrial foi estimado utilizando-se a sonda Dioc₆(3) (iodeto de 3,3-dihexiloxacarbocianina). Esta sonda anfifílica fluorescente se liga à bicamada lipídica de membranas de organelas celulares, sendo possível medir assim o $\Delta\Psi$ mitocondrial pela adição CCCP, desacoplador específico da cadeia respiratória da mitocôndria (CAMPOS et al., 2004). As células foram incubadas na concentração de 1×10^6 /mL em PBS/1 mM MgCl₂ em um volume total de 3800 μ L. Após a retirada de 400 μ L (controle negativo), o restante das células foi incubado na presença de 0,3 nM de Dioc₆(3). As amostras (F) foram protegidas da luz direta e incubadas por 40 minutos. Após este tempo, adicionou-se CCCP em alguns tubos na concentração de 2 μ M (F_{CCCP}). Depois de incubadas por 20 minutos, as leituras foram feitas em citômetro de fluxo (marca FACSCalibur, Becton Dickinson), sob comprimentos de onda de excitação e emissão de 484 e 501 nm, respectivamente. As taxas de fluorescência encontradas foram então divididas (F/F_{CCCP}), sendo o valor atribuído ao $\Delta\Psi$ mitocondrial (CAMPOS et al., 2004).

3.5 Análise estatística

Os testes foram feitos em ao menos quatro dias diferentes em duplicata e a análise dos resultados foi feita através do programa Origin[®] 6.0 (pelo *t*-test), onde valores diferentes com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *T. cruzi*, assim como outros tripanossomatídeos, possui um metabolismo aeróbico, apesar de uma alta atividade de enzimas glicolíticas. Portanto, a cadeia respiratória na espécie está sempre em atividade não importando o estágio do parasita (BRINGAUD et al., 2006). Uma vez que o parasita comprovadamente depende de oxigênio para proliferação e sobrevivência (STOPPANI et al., 1980) a cadeia respiratória é essencial para a sua viabilidade.

Tendo em vista a grande diversidade existente entre as cepas de *T. cruzi* e visando uma comparação entre as mesmas, escolhemos para esse estudo duas cepas (Tulahuen 2 e Y), que apresentam diferenças em relação a vários fatores. A cepa Tulahuen 2 pertence à linhagem I, e a cepa Y pertence à linhagem II, e apresentam marcada heterogeneidade: Mielniczki-Pereira et al (2007) demonstraram que as duas cepas atingem a fase estacionária após cinco dias de incubação, porém com diferentes densidades celulares (número de parasitas final/número de parasitas inicial de $12,97 \pm 1,06$ contra $7,97 \pm 0,92$ das cepas Tulahuen 2 e Y, respectivamente). Diferenças no tempo de duplicação também foram observadas, com a cepa Tulahuen 2 apresentando $29,99 \pm 2,52$ h, enquanto que a cepa Y exibiu tempo de $38,40 \pm 2,56$ h (Mielniczki-Pereira, 2007). Com relação à resistência ao estresse oxidativo, Tulahuen 2 apresentou IC_{50} (concentração de H_2O_2 que inibe 50% do crescimento celular) de $133,1 \pm 2,1 \mu M$, enquanto que a Y exibiu taxa de $98,5 \pm 1,7 \mu M$, além da Tulahuen 2 apresentar uma maior expressão de enzimas antioxidantes (Finzi et al., 2004; Mielniczki-Pereira et al., 2007). A atividade de fostatases, enzimas relacionadas a vias de sinalização celular, também rendeu padrões diferenciados (MORALES-NETO et al., 2009).

O objetivo desse estudo foi esclarecer alguns pontos relacionados à cadeia respiratória do *T. cruzi*, principalmente em relação à funcionalidade do complexo I, ainda discutida na literatura. Nesse sentido, os experimentos foram realizados com diferentes substratos da cadeia respiratória, malato/piruvato (M/P) (complexo I e II), succinato (S) (complexo II) e malato/piruvato/malonato (M/P/M) (complexo I), sendo o malonato um inibidor competitivo da succinato desidrogenase (complexo II) (GRIVENNIKOVA et al., 1993).

Em relação ao consumo de oxigênio, o emprego dos diferentes substratos da cadeia respiratória não resultou em diferença significativa nas taxas nas diferentes fases de proliferação (Figura 4). Porém, este consumo variou tanto entre as cepas, como entre as diferentes fases de proliferação na mesma cepa. Tulahuen 2 (Figura 4A) teve um aumento de aproximadamente 28% no consumo da fase log (3 dias) para as fases estacionária (5 dias) e

estacionária tardia (7 dias) onde mantiveram essa taxa. Já na cepa Y (Figura 4B) o consumo se manteve constante entre as fases log e estacionária e aumentou em 100% na estacionária tardia. As diferenças observadas com 3 e 5 dias entre as cepas podem ser justificadas pela diferença observada em suas curvas de proliferação, onde a cepa Tulahuen 2 apresenta uma maior taxa de crescimento em relação à cepa Y (MIELNICZKI-PEREIRA et al., 2007), o que pode exigir uma maior demanda de energia via cadeia respiratória e, conseqüentemente, maior consumo de oxigênio. Ainda, entre as duas cepas, a Tulahuen 2 possui maiores taxas de consumo de oxigênio em todas as fases de proliferação, consumindo 147, 214 e 56% a mais nas fases log, estacionária e estacionária tardia, respectivamente, em relação à cepa Y (Figura 4).

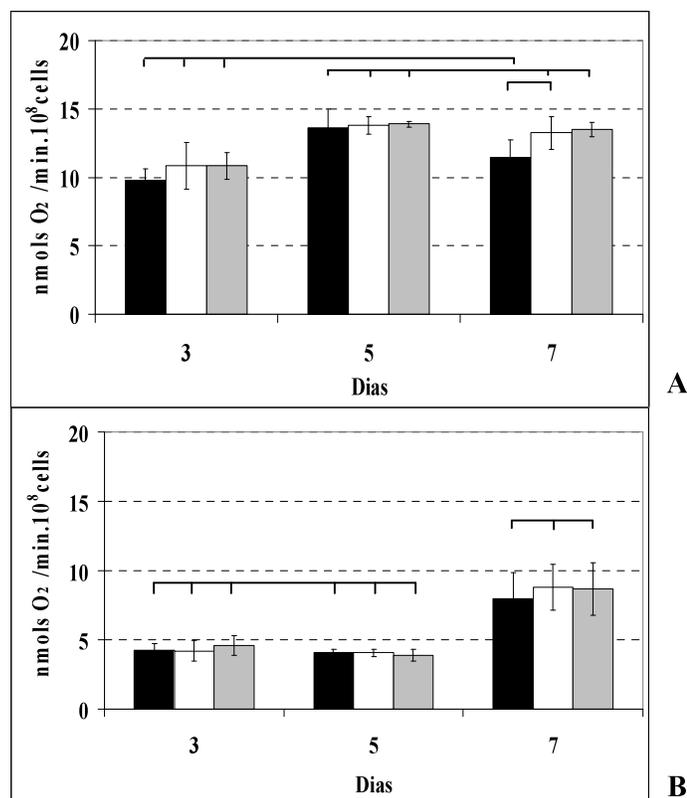


Figura 4: Consumo de oxigênio de *T. cruzi* ao longo da curva de proliferação (A - Tulahuen 2; B - Y). As células (1×10^8 /mL) nas diferentes fases de proliferação foram adicionadas ao meio de reação padrão na presença de Malato 5 mM + Piruvato 5 mM (barras pretas), Malato 5 mM + Piruvato 5 mM + Malonato 10 mM (barras brancas) ou Succinato 5 mM (barras cinzas). Análise estatística: $p > 0,05$, para os grupos indicados.

Através do consumo de oxigênio é possível determinar as taxas de controle respiratório (CR) pela razão entre a medida do consumo após a adição de ADP (Estado 3),

que estimula o consumo e após a adição de oligomicina (Estado 4), que bloqueia a porção F_0 do complexo ATPase, diminuindo o consumo de oxigênio. Esta razão indica o quanto a cadeia transportadora de elétrons está acoplada à fosforilação oxidativa. Na cepa Tulahuen 2 (Figura 5A) o CR não variou entre os diferentes substratos, contudo, houve uma queda no seu valor até atingir 7 dias (CR \cong 1,7) em relação a 3 dias. Com a cepa Y (Figura 5B), também não houve variação do CR com diferentes substratos, variando de modo geral entre os diferentes dias da curva de proliferação (CR \cong 1,7) de modo que com 7 dias houve um pequeno decréscimo nas taxas.

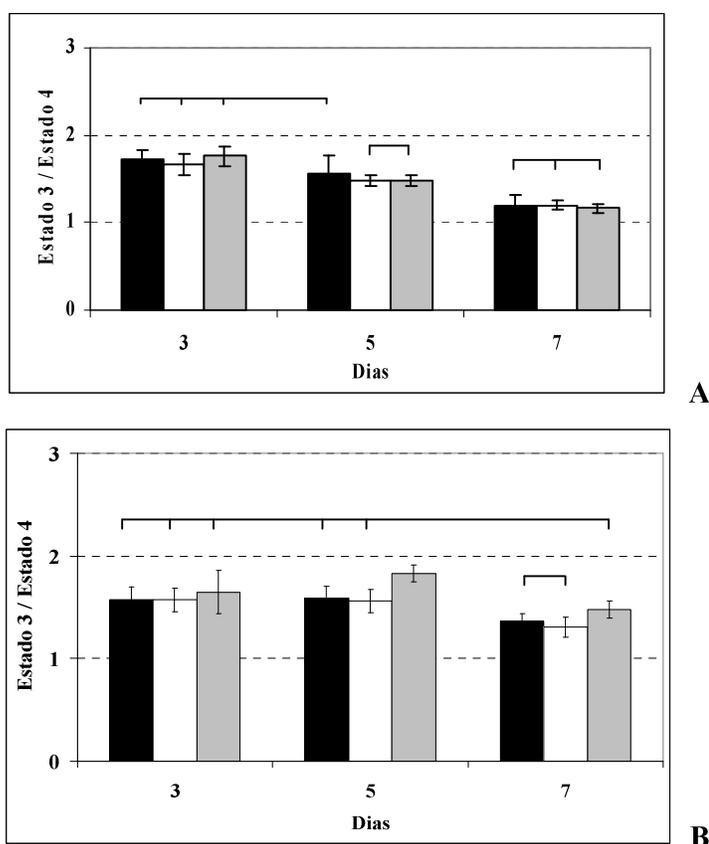


Figura 5: Controle respiratório de *T. cruzi* ao longo da curva de proliferação (A - Tulahuen 2; B - Y). As condições experimentais foram as mesmas da Figura 4. CR: Razão do consumo de O_2 na presença de ADP (400 μ M), Estado 3, pelo consumo de oxigênio na presença de oligomicina (2 μ g/mL), Estado 4. Análise estatística: $p > 0,05$ para grupos.

Empregando o CCCP, um desacoplador da fosforilação oxidativa, podemos avaliar a velocidade máxima do consumo de oxigênio da cadeia respiratória. As taxas de velocidade

máxima de consumo de oxigênio obtidas pela adição de CCCP na cepa Tulahuen 2 (Figura 6A) também não variaram de forma significativa com os diferentes substratos. Um aumento discreto, mas significativo (18%) foi observado no 5º dia de proliferação em relação ao 3º e um aumento médio de 45% no 7º em relação ao 5º dia também foi registrado. Na cepa Y (Figura 6B) nenhuma diferença significativa foi observada com os substratos ou nas diferentes fases de proliferação, mostrando a constância do CR desta cepa ao longo da curva. As taxas de velocidade máxima de consumo de oxigênio da cepa Y foram equivalentes às da cepa Tulahuen 2 no 3º e 5º dia. Entretanto, na cepa Tulahuen 2 essa taxa foi maior no 7º (53%) quando comparada à Y.

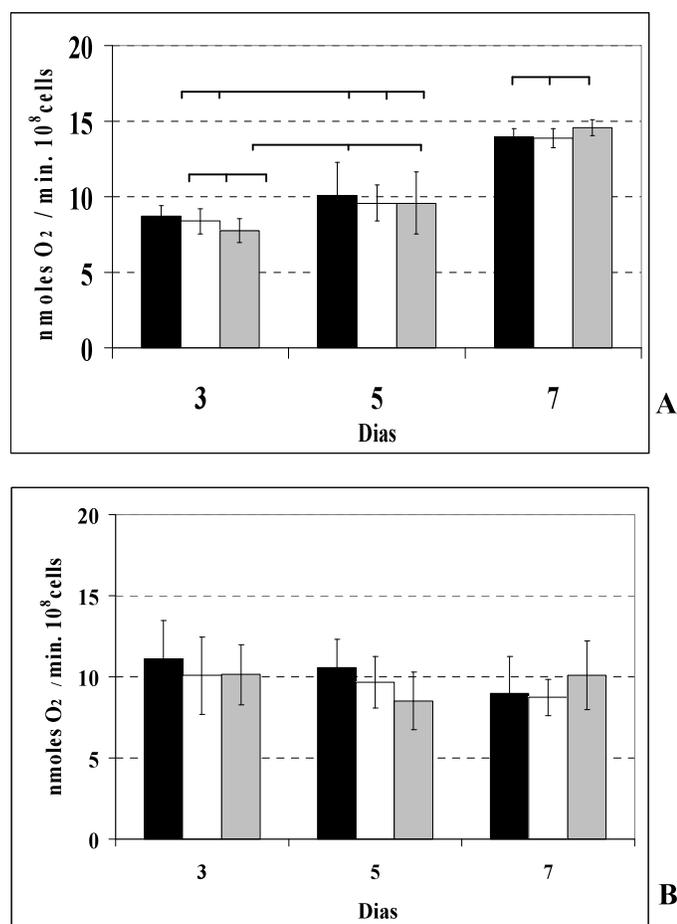


Figura 6: Velocidade máxima do consumo de oxigênio de *T. cruzi* ao longo da curva de proliferação (A - Tulahuen 2; B - Y). As condições experimentais foram as mesmas descritas na Figura 4, com a adição de CCCP (1 μ M). Análise estatística: $p > 0,05$ (A) e não significativo para nenhum grupo (B).

Como não estávamos encontrando diferenças nas taxas de consumo de oxigênio com os diferentes substratos, levantamos a possibilidade do malonato não estar inibindo completamente o complexo II. Neste sentido, decidimos determinar as taxas de inibição do malonato após o emprego de substratos do complexo I e II e somente de complexo II (Figura 7).

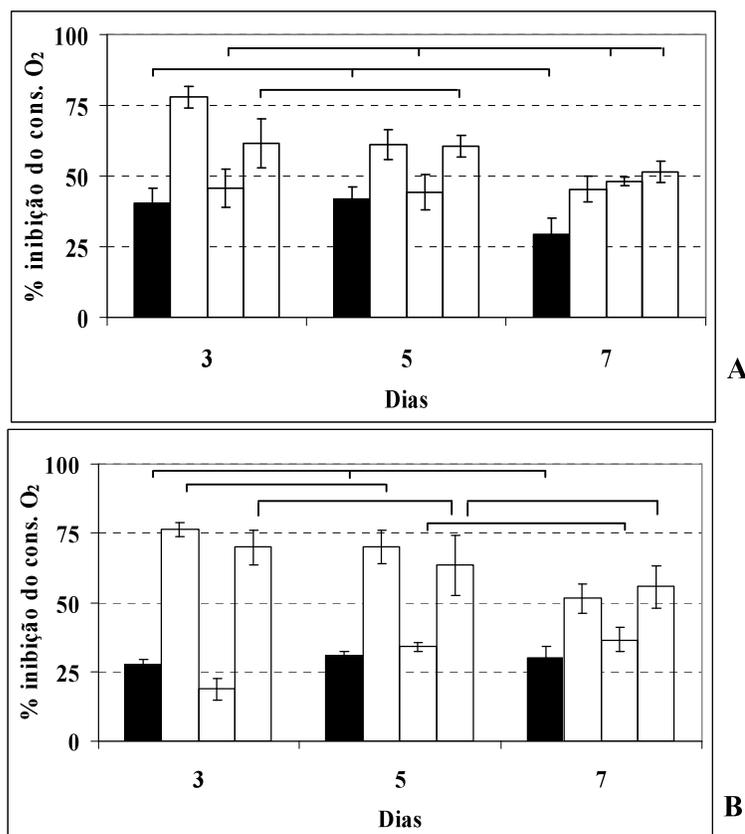


Figura 7: Inibição do consumo de oxigênio pelo malonato em *T. cruzi* ao longo da curva de proliferação (A - Tulahuen 2; B - Y). 1×10^8 células/mL foram incubadas ao meio de reação padrão na presença de 5 mM de malato + 5 mM de piruvato (MP) ou 5 mM de succinato (SUC). Após a determinação do consumo de O₂ basal, 10 mM de malonato foi adicionado e o percentual de inibição determinado (MP – barras pretas, SUC – barras brancas). O ensaio também foi reproduzido em células incubadas por 3 horas em PBS/Mg²⁺ na presença de MP (barras pretas pontilhadas) ou SUC (barras brancas pontilhadas). Consumo de oxigênio basal das cepas (valores em nmoles/min.10⁸ céls): Tulahuen 2 (MP: ~ 8,5; 8,97 e 9,96; SUC: ~8,75; 8,07 e 9,87 para 3, 5 e 7 dias, respectivamente) e Y (MP: ~ 4,15; 5,28 e 8,44; SUC: ~ 3,68; 5,33 e 7,97 para 3, 5 e 7 dias, respectivamente). Consumo de oxigênio das células incubadas por 3 horas em PBS/Mg²⁺ (valores em nmoles/min.10⁸ céls): Tulahuen 2 (MP: ~ 5,85; 5,03 e 6,66; SUC: ~ 5,92; 4,89 e 6,59 para 3, 5 e 7 dias, respectivamente) e Y (~ 2,74; 3,46 e 5,88; SUC: 2,69; 3,28 e 4,79 para 3, 5 e 7 dias, respectivamente). Análise estatística: $p > 0,05$ para os grupos indicados.

Assim, utilizando-se o SUC como substrato, as taxas de inibição com a administração de 10 mM de malonato tanto na cepa Tulahuen 2 (Figura 7A) como na Y (Figura 7B) foram reduzindo do 3° para o 7° dia na mesma proporção para o substrato SUC. Estas taxas ficaram em torno de 75% em ambas as cepas, não variando entre elas com 3 dias de proliferação. No 5° dia (taxas de inibição de 61% e 70% para Tulahuen 2 e Y, respectivamente) e no 7° dia as taxas de inibição entre as cepas foram semelhantes (taxas de inibição de 45% e 51% para Tulahuen 2 e Y, respectivamente). Com os substratos MP, as taxas de inibição foram maiores no 3° e 5° dias, ficando semelhantes no 7° dia de proliferação. Ainda, vale destacar que os percentuais de inibição com malonato 10 mM foram significativamente diferentes entre as cepas no 3° e 5° dias de proliferação (~ 40% de inibição na cepa Tulahuen 2 e 30% na cepa Y, $p < 0,05$), sendo os percentuais semelhantes no 7° dia de proliferação. Os resultados aqui encontrados são similares àqueles determinados em *T. brucei* (BEATTIE et al., 1994). Em *T. cruzi* (cepa Costa Rica), inibição semelhante à obtida com M/P foi observada na ausência de substratos exógenos (SYLVESTER & KRASSNER, 1976).

Uma vez que as formas epimastigotas do *T. cruzi* são capazes de armazenar carboidratos nos reservossomos (CUNHA-E-SILVA et al., 2002), para demonstrar a dependência do consumo de oxigênio de substratos exógenos, as células foram incubadas em PBS/Mg²⁺ por 3 horas assim como descrito para *Leishmania donovani* (SANTHAMMA & BHADURI, 1995). As taxas de consumo de O₂ foram menores que as células sem incubação (Figura 7, barras pontilhadas), porém os padrões de inibição foram semelhantes em ambas as cepas. Utilizando succinato como substrato (Figuras 7A e 7B, barras brancas pontilhadas), os percentuais de inibição somente foram diferentes para o SUC na cepa Tulahuen 2 com um decréscimo de 21% ($p < 0,05$). Nos outros dias de proliferação e também na cepa Y, as taxas de inibição foram semelhantes. Utilizando-se MP o malonato levou a uma menor inibição do consumo de oxigênio em ambas as cepas.

Diante desses resultados levantamos as seguintes hipóteses: a concentração de 10 mM de malonato usada nos experimentos poderia ser baixa frente à concentração de succinato no ambiente intracelular o que reduziria sua capacidade de inibir o complexo II ou o complexo II poderia ter uma estrutura diferente do de mamíferos, conforme sugeriram Morales e colaboradores (2002). Uma vez que em *L. donovani* (SANTHAMMA & BHADURI, 1995), a inibição da cadeia respiratória é total com 25 mM de malonato; decidimos testar esta concentração nas nossas condições experimentais (Figura 8). As taxas de inibição giraram em torno de 50-75% ao longo da curva de proliferação na respiração sustentada por SUC, e 25-50% na respiração sustentada por MP (Figura 8). Entretanto, na cepa Y com o substrato

MP registrou-se um discreto, mas significativo aumento na taxa de inibição com 25 mM (\cong 20%). Os resultados demonstram que em *T. cruzi* o malonato em maiores concentrações não leva a uma maior inibição da cadeia respiratória. Estes dados mostram que a cadeia respiratória de *T. cruzi* e *L. donovani* comportam-se de modo diferente no que tange a inibição da cadeia respiratória com malonato, uma vez que uma maior concentração do inibidor (25 mM) não leva a uma maior inibição do complexo II, como observado para *L. donovani* (SANTHAMMA & BADHURI, 1995).

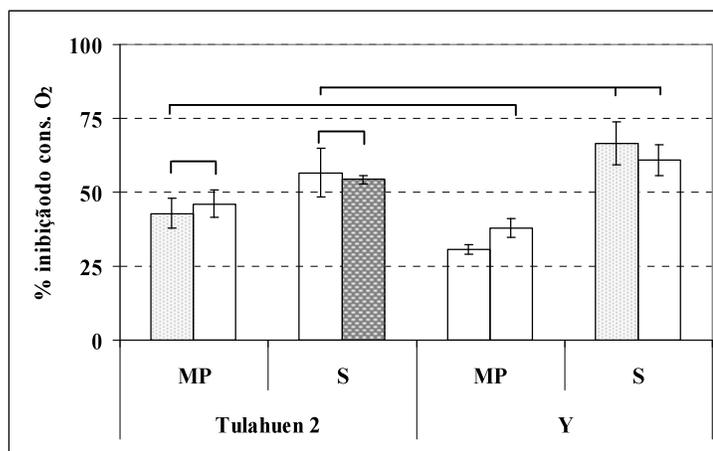


Figura 8: Efeito do malonato em diferentes concentrações no consumo de oxigênio de *T. cruzi*. As células foram crescidas por 5 dias (ver Material e Métodos), com a adição de malonato nas concentrações de 10 mM (barras claras) e 25 mM (barras escuras) na respiração suportada por malato 5 mM/piruvato 5 mM (MP) ou succinato 5 mM (S). Consumo de oxigênio basal das cepas (valores em nmoles/min.10⁸ céls): Tulahuen 2 (\sim 8,97 \pm 1,32 e 8,07 \pm 1,82 para as taxas com malato/piruvato (MP) e succinato (S), respectivamente) e Y (\sim 5,28 \pm 2,04 e 5,33 \pm 1,67 para as taxas com malato/piruvato (MP) e succinato (S), respectivamente). Análise estatística: $p > 0,05$ para os grupos indicados.

Através dos resultados discutidos nas Figuras 7 e 8, concluímos que a utilização do malonato na concentração de 10 mM não permitiu a comprovação da funcionalidade do complexo I. Sendo assim, com os substratos M/P + Malon, como o complexo II não está completamente inibido, este ainda contribui para o consumo de oxigênio, o que explica a similaridade encontrada nas taxas de respiração na presença de M/P, M/P + Malon e Suc (Figura 4). Estes dados estão de acordo com o descrito para outras cepas de *T. cruzi* onde não observa-se diferenças nas taxas de consumo de oxigênio na presença de M/P ou SUC (Carranza et al., 2009).

Um resultado interessante foi o fato das taxas de consumo de O₂ serem altas na fase estacionária, o que poderia indicar um aumento da atividade da succinato desidrogenase, pela importância do succinato no metabolismo deste parasita.

Assim, resolvemos determinar a atividade dessa enzima para ver se a mesma seria a responsável por este aumento nas taxas de consumo de O₂.

Na Figura 9 observa-se que a enzima apresentou uma maior atividade na fase *log* de proliferação em ambas as cepas. Em Tulahuen 2, a atividade da enzima diminuiu 45% no 5° dia em relação à fase log e se manteve no 7° dia de proliferação na cepa. Em Y o comportamento foi bem semelhante: a atividade enzimática foi maior no 3° dia, porém diminuiu ainda mais no 5° em relação à Tulahuen 2 (62%) e não se alterou significativamente na fase estacionária.

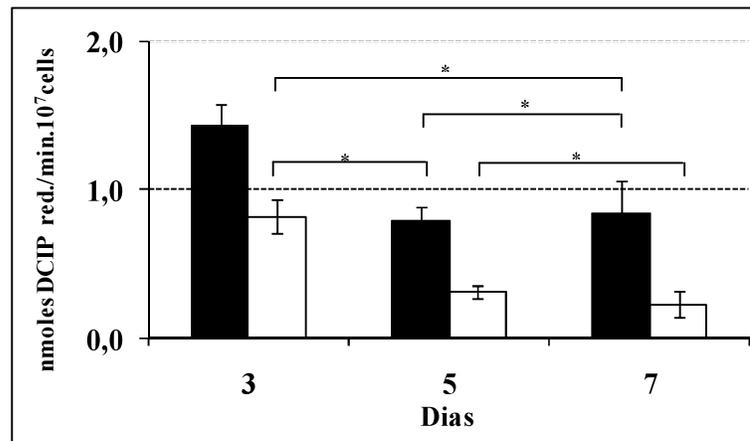


Figura 9 – Atividade da succinato desidrogenase ao longo da curva de proliferação de *T. cruzi* (Tulahuen 2 - barras pretas; Y – barras brancas). As condições experimentais estão descritas em Material e Métodos. Análise estatística (*t*-test): $p > 0,05$, para os grupos indicados.

Estes resultados indicam que não se pode correlacionar o maior consumo de oxigênio da fase estacionária (Figura 4) com uma maior atividade da succinato desidrogenase, uma vez que o consumo de oxigênio foi o inverso da atividade dessa enzima. Assim, este aumento nas taxas de respiração encontradas nas cepas deve estar relacionado a outro fator ainda não identificado em *T. cruzi*.

O cianeto de potássio (KCN) é um inibidor do complexo IV bloqueando a redução do oxigênio a H₂O, resultando na inibição do consumo de oxigênio e conseqüente depleção na produção de ATP (LASH et al., 1996). A administração de 2 mM de KCN após a respiração basal das cepas Tulahuen 2 e Y (Figuras 10A e 10B) não inibiu completamente a taxa de

consumo de oxigênio, que ficam em torno de 90% na cepa Tulahuen 2 (Figura 10A). Na cepa Y o comportamento foi semelhante (Figura 10B), estando de acordo com o publicado por Docampo et al. (1978). Comparando-se as duas cepas, observa-se que as taxas permaneceram quase sempre constantes, salvo entre Tulahuen 2 e Y nos substratos MP no 5º dia de proliferação (Figuras 10A e 10B).

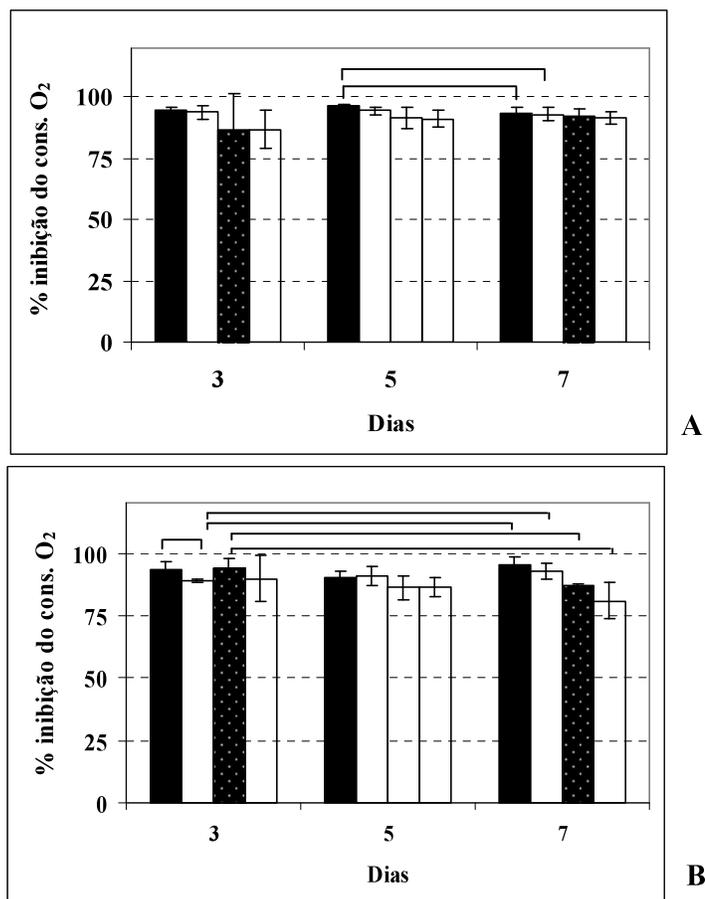


Figura 10: Inibição do consumo de O₂ pelo KCN após respiração basal em *T. cruzi* ao longo da curva de proliferação. 1×10^8 células/mL (A - Tulahuen 2; B - Y) foram incubadas em meio de reação padrão nas mesmas condições experimentais da Figura 7. Células sem incubação (MP - barras brancas; SUC - barras pretas) e incubadas por 3 horas em PBS/Mg²⁺ (MP - barras pretas pontilhadas; SUC - barras brancas pontilhadas, mas com a adição de 2 mM de KCN. Análise estatística: $p < 0,05$ para os grupos indicados.

Estes dados demonstram que o comportamento das cadeias respiratórias de Tulahuen 2 e Y são semelhantes quando inibidas pelo KCN em qualquer fase do proliferação. Outro fator relevante é o não-bloqueio completo da cadeia respiratória com o KCN. Sabe-se que a adição deste composto na concentração de 1 mM tem efeitos inibitórios em *Leishmania*

donovani (~ 90%) (AFFRANCHINO et al., 1986) semelhantes aos encontrados neste trabalho e que a adição de 2 mM de KCN é usada para estudar oxidases alternativas de *T. brucei* (Fang et al., 2003). Contudo, em nossas condições experimentais, mesmo com a administração de 2 mM de KCN os resultados não se alteraram, restando um consumo de oxigênio basal independente do substrato utilizado ou da fase de proliferação. Nas células que foram incubadas por 3 horas em PBS/Mg²⁺, onde o KCN foi adicionado logo após a determinação da respiração basal (Figuras 10A e 10B) os padrões de inibição foram semelhantes às células que não foram incubadas, apesar de apresentarem menores taxas de consumo de oxigênio.

Estes dados sugerem que há outra fonte de consumo de O₂ além do Complexo IV no *T. cruzi*. Acredita-se que uma possível fonte desse consumo seja a enzima fumarato redutase (FRD), que converte o fumarato a succinato, uma vez que esta enzima pode consumir O₂ e produzir H₂O₂ (DENICOLA-SEOANE et al., 1992). Não há evidências da presença de oxidase alternativa ligada à cadeia respiratória de *T. cruzi*, o que poderia explicar o aumento nas taxas de consumo de oxigênio na fase estacionária. Porém, é importante lembrar que a produção de H₂O₂ no *T. cruzi* é da ordem de picomoles (CARRANZA et al., 2009) e é muito menor que o consumo de oxigênio, da ordem de nanomoles (Figura 4). Assim, nossos resultados apontam para outras fontes de consumo de O₂, ligadas ou não à cadeia respiratória ainda não caracterizadas.

Em conjunto, esses resultados demonstram diferenças no consumo de oxigênio ao longo da curva de proliferação nas duas cepas, que poderia refletir numa diferença de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). Assim, o $\Delta\Psi$ (Figura 11) foi determinado por citometria de fluxo na presença de DiOC₆(3) (SRIVASTAVA et al., 1997; CAMPOS et al., 2004). O valor do $\Delta\Psi$ é o resultado da divisão da fluorescência total (emitida pela sonda ligada à toda a célula) pela fluorescência emitida após a adição de 1 mM de CCCP. Como esta sonda se liga também em outros locais da célula, a adição de CCCP funciona como um controle para se determinar a quantidade de DiOC₆(3) ligado especificamente à mitocôndria, sendo possível assim determinar o $\Delta\Psi$ mitocondrial. Os resultados obtidos com o $\Delta\Psi$ mostraram um perfil semelhante entre as duas cepas (Figura 11) ao longo da curva de proliferação.

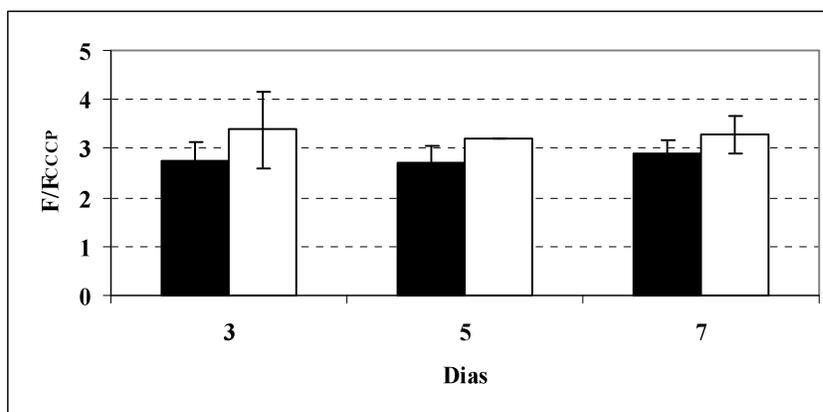


Figura 11: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) de *Trypanosoma cruzi* ao longo da curva de proliferação. 1×10^6 células/mL foram incubadas em PBS e o $\Delta\Psi$ foi detectado por citometria de fluxo conforme descrito em Material e Métodos. Análise estatística: $p > 0,05$ para todos os grupos.

Em suma, o presente trabalho traz importantes informações nunca antes descritas na literatura no nosso entendimento sobre vários aspectos do *T. cruzi*. Concluiu-se que o malonato de fato não é um inibidor efetivo do complexo II na espécie, mesmo em altas concentrações não levou a uma inibição completa do complexo (Figura 8). Isso sugere uma diferença entre os complexos do parasita e o dos mamíferos, uma vez que o inibidor é efetivo neste último (MACIEL et al, 2004).

Outro ponto importante levantado neste trabalho é o não-bloqueio da cadeia respiratória com KCN. Uma possibilidade é a presença de oxidases alternativas já descritas em formas tripomastigotas sanguíneas de *T. brucei*, mas estas ainda não foram identificadas em *T. cruzi* (OPPERDOES & MITCHELS, 2008).

Em suma, os resultados apresentados fornecem valiosas informações sobre a cadeia respiratória do *T. cruzi*, além de servir como base para futuros experimentos visando a caracterização de vias e reações que ainda permanecem obscuros nesse parasita.

5. CONCLUSÃO

- A utilização de diferentes substratos não resultou em diferenças nos parâmetros bioenergéticos. Entretanto, diferenças significativas foram observadas nas cepas estudadas que interessantemente não resultaram em variações significativas no potencial de membrana mitocondrial.
- O malonato demonstrou ser um inibidor ineficaz do complexo II do *T. cruzi*.
- A atividade da enzima succinato desidrogenase não pode ser correlacionada ao aumento do consumo de O₂ na fase estacionária.
- A inibição ao nível de citocromo c oxidase pelo KCN não bloqueou completamente o consumo de oxigênio pela cadeia respiratória.

A não inibição completa do complexo II do *T. cruzi* pelo malonato, o aumento do consumo de oxigênio na fase estacionária tardia em relação à fase *log*, não podendo ser atribuído ao aumento da atividade do complexo II e a não inibição total do consumo de oxigênio na presença de cianeto sugerem que outras vias de consumo de oxigênio ainda não identificadas estejam presentes no parasita.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFRANCHINO, J. L.; SCHWARCZ DE TARLOVSKY, M. N.; STOPPANI, A. O. M. Terminal oxidases in the trypanosomatid *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.85B, n.2, p.381-388, 1986.

BARCAN, L LUNAO C, CLARA L, SINAGRA A, VALLEDOR A, DE RISSIO AM, GADANO A, GARCIA MM, SANTIBANES E AND RIARTE A. Transmission of *T. Cruzi* Infection Via Liver Transplantation to a Nonreactive Recipient for Chagas' Disease. *Liv. Transpl.*, v.11, n.9, p.1112-1116, 2005.

BEATTIE, D. S.; OBUNGU, V. H.; KIAIRA, J. K. Oxidation of NADH by a rotenone and antimycin-sensitive pathway in the mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.64, p.87-94, 1994.

BENCHIMOL BARBOSA, P. R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int. J. Cardiol.*, v.112(1), p.132-3, 2006.

BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J. Cell. Biol.*, v.106, p.1349-1358, 1988.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.27, p.343-382, 1973.

BRENER, Z.; ZILTON, A. A., BARRAL-NETO, M. 2ª edição. *Rio de Janeiro*: Guanabara Koogan, 2000.

BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; CUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.149, p.1-9, 2006.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.27, p.175-200, 1995.

CAMPOS, C. B. L.; DEGASPERI, G. R.; PACÍFICO, D. S.; ALBERICI, L. C.; CARREIRA, R. S.; GUIMARÃES, F.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. bupropfen-

induced Walker 256 tumor cell death: cytochrome c release from functional mitochondria and enhancement by calcineurin inhibition. *Biochem Pharmacol.*, v. 68, p. 2197-2206, 2004.

CAZZULO, J. J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J.*, v.6, p.3153-3161, 1992.

CECCHINI, G. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem.*, v.77, p.77-109, 2003.

CARRANZA, J. C.; KOWALTOWSKI, A. J.; MENDONÇA, M. A.; DE OLIVEIRA, T. C.; GADELHA, F. R.; ZINGALES, B. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *J. Bioenerg. Biomembr.*, v.41(3), p.299-308, 2009.

CHAUDHURI, M.; OTT, R. D.; HILL, G. C. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.*, v. 22(10), p.484-91, 2006.

CHAUMONT, F.; SCHANCK, A. N.; BLUM, J. J.; OPPERDOES, F. R. Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.67, p.321-31, 1994.

CHRISTMAS, P.; TURRENS, J. F. Separation of NADH-fumarate reductase and succinate dehydrogenase activities in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Let.*, v.183, p. 225-228, 2000.

COURA, J. R. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30(1), p.45-47, 1997.

CUNHA-E-SILVA, N. L.; ATELLA, G. C.; PORTO-CARREIRO, I. A.; MORGADO-DIAZ, J. A.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, W. Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Let.*, v. 214, p. 7-12, 2002.

DE BOISO, J. F.; DOCAMPO, R.; STOPPANI, A. O.; FRASCH, A. C. Effect of antimycin A on the respiration and growth of *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)*, v.39(3), p.362-368, 1979.

DENICOLA-SEOANE, A.; RUBBO, H.; PRODANOV, E.; TURRENS, J. F. Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem Parasitol.*, v.54(1), p.43-50, 1992.

DIAS, J. P. C.; COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas – uma abordagem prática para o clínico geral. 1ª edição. *Rio de Janeiro*: Fiocruz, 1997.

DIAS, JCP. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.28(2), abril/junho 2006.

DUTRA, P. M. L., COUTO, L. C., LOPES, A. C. H. S., MEYER-FERNANDES, J. R. Characterization of ecto-phosphatase activities of *Trypanosoma cruzi*: a comparative study between Colombiana and Y strains. *Acta Trop.* v.100, p.88-95, 2006.

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C. V.; NAIFF, R. D.; BARRETT, T. Y. V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.58, n.6, p.807–811, 1998.

FERREIRA, I. L. M.; TABOSA E SILVA, T. P. [Editorial]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39, n.5, 2006.

FINZI, J. K.; CHIAVEGATTO, C. W. M.; CORAT, K. F.; LOPEZ, J. A.; CABRERA, O. G.; MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M.; GADELHA, F. R. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.133(1), p.37-43, 2004.

FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v.14, p.265-299, 1980.

FRAGATA FILHO, A. A.; CORREIA, E. B.; FILHO, R. B.; VASCONCELOS, M. O.; JANCZUK, D.; SOUZA MARTINS, C. S. Sequence of unusual Chagas infection

transmissions in the same family: mother by blood transfusion and child congenitally, with a treatment-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. Med. Trop.*, vol.41(1), p.73-75, 2008.

GABALDÓN, T.; RAINEY, D.; HUYNEN, M. A. Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J. Mol. Biol.*, v.348, p.857-870, 2005.

GRIVENNIKOVA, V. G., GAVRIKOVA, E. V., TIMOSHIN, A. A., AND VINOGRADOV, A. D. Fumarate reductase activity of bovine heart succinate-ubiquinone reductase. *Biochimica et biophysica acta*, v.1140, p.282-292, 1993.

HERNANDEZ, F. R.; TURRENS, J. F. Rotenone at high concentrations inhibits NADH-fumarate reductase and the mitochondrial respiratory chain of *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.93, p.135-137, 1998.

IGOILLO-ESTEVE, M.; CAZZULO, J. J. The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.149, p. 170-181, 2006.

LASH, L. H.; TOKARZ, J. J.; CHEN, Z.; PEDROSI, B. M.; WOODS, E. B. ATP Depletion by Iodoacetate and Cyanide in Renal Distal Tubular Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.276, p.194-205, 1996.

MACIEL, E. N.; KOWALTOWSKI, A. J.; SCHWALM, F. D.; RODRIGUES, J. M.; SOUZA, D. O.; VERCESI, A. E.; WAJNER, M.; CASTILHO, R. F. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca^{2+} and respiratory chain complex II inhibition. *J. Neurochemistry*, v.90, p.1025-1035, 2004.

MACEDO, A. M. PIMENTA, J. R.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. I.; CHIARI, E.; ZINGALES, B.; PENA, S. D.; OLIVEIRA, R. P. Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, p.407-413, 2001.

- MAYA, J.; REPETTO, Y; AGOSÍN, M.; OJEDA, J. M.; TELLEZ, R.; GAULE, C.; MORELLO, A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.86, p.101-106, 1997.
- MASLOV, D. A.; ZIKOVÁ, A.; KYSELOVÁ, I.; LUKE, J. A putative novel nuclear-encoded subunit of the cytochrome *c* oxidase complex in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.125(1-2), p.113-125, 2002.
- MIELNICZKI-PEREIRA, A. A.; CHIAVEGATTO, C. M.; LÓPEZ, J.A.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M.; GADELHA, F. R. *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities. *Acta Trop.*, v.101, p. 54-60, 2007.
- MIRANDOLA, S. R.; MELO, D. R.; SCHUCK, P. F.; FERREIRA, G. C.; WAJNER, M.; CASTILHO, R. F. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J. Inherit. Metab. Dis.*, v.31, p.44-54, 2008.
- MORALES, J.; MOGI, T.; MINEKI, S.; TAKASHIMA, E.; MINEKI, R.; HIRAWAKE, H.; SAKAMOTO, K.; OMURA, S.; KITA, K. Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of twelve peptides including a heterodimeric ip subunit *J. Biol. Chem.*, v.284(11), p.7255-7263, 2002.
- MORALES-NETO, R.; HULSHOF, L.; FERREIRA, C. V.; GADELHA, F. R. Distinct phosphatase activity profiles in two strains of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasit.*, v. 2009.
- MOREL, C. M. Chagas disease, from discovery to control - and beyond: history, myths and lessons to take home. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, sup.1, p.3-16, 1999.
- NJOGU, R. M.; WHITTAKER, C. J.; HILL, G. C. Evidence for a branched electron transport chain in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem. Parasitol.*, v.1. p.13-29, 1980.
- OPPERDOES, F.; MICHELS, P. A. M. Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends in Parasitol.*, v.24(7), p.310-317, 2008.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; KELLY, J. M.; WILKINSON, S. R.; RADI, R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem. J.*, v.410, p.359-368, 2008.

PIACENZA, L.; ZAGO, M. P.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; BASOMBRI, M. A.; RADI, R. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int. J. Parasitol.*, v.39(13), p.1455-64, 2009.

PIÑERO, M. D.; PARODI-TALICE, A.; ACARI, T.; ROBELLO, C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene*, v.408, p.45-50, 2008.

RUBBO, H.; DENICOLA, A.; RADI, R. Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.308(1), p.96-102, 1994.

SANTHAMMA, K. R.; BHADURI, A. Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 75, p.43-53, 1995.

SINGER, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alpha-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem. Anal.*, v.22, p.123-175, 1974.

SRIVASTAVA, I. K.; ROTTENBERG, H.; VAIDYA, A. B. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.3961-3966, 1997.

STOPPANI, A. O.; DOCAMPO, R.; DEBOISO, J. F.; FRASCH, A. C. C. Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on *Trypanosoma cruzi* respiration and growth. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.2, n.1, p.3-21, 1980.

STURM, N. R.; VARGAS, N. S.; WESTENBERGER, S. J.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.*, v.33, p.269-279, 2003.

SPOTORNO, A. E.; CÓRDOVA, L.; SOLARI I, A. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I subgroups through characterization of cytochrome b genes sequences. *Infec. Genet. Evol.*, v.8, p.898-900, 2008.

SYLVESTER, D.; KRASSNER, S. M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.55B, p.443-447, 1976.

TIELENS, A. G. M.; VAN HELLEMOND, J. J. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. *Parasitol. Today*, v.14, n.7, p.265-271, 1998.

TOMAZI, L.; KAWASHITA, S. Y.; PEREIRA, P. M.; ZINGALES, B.; BRIONES, M. R. S. Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic. *Gen. Mol. Res.*, v.8(2), p.458-476, 2009.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.*, v. 31, p. 472-481, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the first Meeting of WHO strategic and Technical Advisory Group on Neglected Tropical Diseases. *Geneva, Switzerland*, p.1-26, 2007.

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M. R. S. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, v.94, n.1, p.159-164, 1999.