

Introdução

A doença de Chagas, provocada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas e permanece sem cura, vacina ou tratamento eficaz. Essa acomete cerca de 20 milhões de pessoas, sendo que 90 milhões vivem em áreas de risco, principalmente nas Américas Central e do Sul. O complexo grau de heterogeneidade intraespecífico do parasita é um grande obstáculo para o desenvolvimento de terapias mais efetivas.

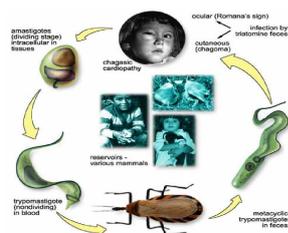


Figura 1 – Ciclo de vida do *T. cruzi*

A mitocôndria exerce papel fundamental na sobrevivência do parasita principalmente pela produção de ATP, regulação da concentração intracelular de cálcio, termogênese e controle da apoptose, além de ser a principal fonte geradora de espécies reativas de oxigênio. Uma melhor compreensão da bioenergética mitocondrial em diferentes cepas poderá levar à identificação de novos alvos para o desenvolvimento de uma terapia mais específica.

Objetivo

Analisar comparativamente o consumo de oxigênio, potencial de membrana mitocondrial e a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido (O_2^-) pela mitocôndria ao longo da curva de proliferação de duas cepas de *T. cruzi*: Tulahuen 2 e Y empregando-se diferentes substratos.

Material e métodos

1) Cultura de células:

Células de *T. cruzi* (epimastigota) foram inoculadas em meio de cultura e após 3 (fase log), 5 (início de fase estacionária) e 7 (fase estacionária) dias de proliferação as células foram coletadas por centrifugação, lavadas e resuspensas em meio adequado para cada metodologia. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer.

2) Determinação do potencial de membrana mitocondrial:

1×10^6 células/mL foram incubadas em PBS na presença de DiOC₃(3) (0.3nM) por 40 min e na presença de CCCP (1 μ M) por mais 30 min. Após esse período o potencial de membrana mitocondrial foi determinado por citometria de fluxo.

3) Determinação da produção de ânion superóxido:

1×10^6 células/mL foram incubadas em PBS com 1 mM de MgCl₂ na presença de DHE (2 μ M) por 40 min e na presença de antimicina A (1 μ g/mL) e TTFa (500 μ M) por mais 30 min. Após esse período a geração de O_2^- foi determinada por citometria de fluxo.

4) Determinação da produção de peróxido de hidrogênio:

1×10^6 células/mL foram incubadas em PBS/ 1mM MgCl₂ na presença de digitonina (40 μ M), HRP (1 U/mL), e da sonda Amplex Red (50 μ M) e dos substratos para o complexo I (5mM de malato e 5mM de piruvato) ou substratos para o complexo I + inibidor do complexo II (5 mM de malato e 5 mM de piruvato + malonato) ou substrato para o complexo II (5 mM de succinato). A produção de H_2O_2 foi determinada em fluorímetro nos comprimentos de 563 nm de excitação e 587 nm de emissão.

5) Determinação do consumo de oxigênio:

1×10^6 células/mL foram incubadas conforme descrito no item 4 e o consumo de oxigênio foi determinado em oxígrafo Hansatech.

Resultados

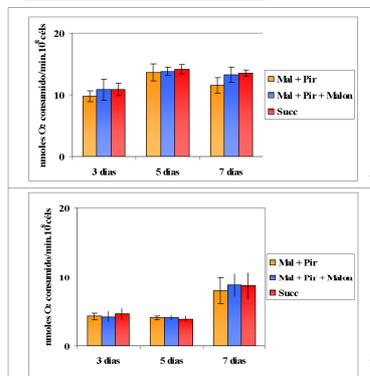


Figura 2: Avaliação do consumo basal de oxigênio nas cepas Tulahuen 2 (A) e Y (B) ao longo da curva de proliferação. 1×10^6 células/mL foram incubadas conforme descrito no item 5. Análise estatística (t-test): p (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) < 0,05.

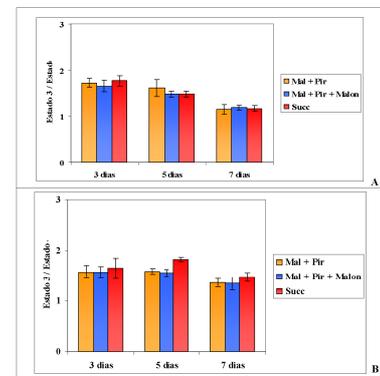


Figura 3: Avaliação do controle respiratório nas cepas Tulahuen 2 (A) e Y (B) ao longo da curva de proliferação. As condições experimentais foram as mesmas da figura 2, adicionando-se 400 μ M ADP (estado 3) e 1 μ g/mL Oligomicina (estado 4). Análise estatística (t-test): p (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) < 0,05.

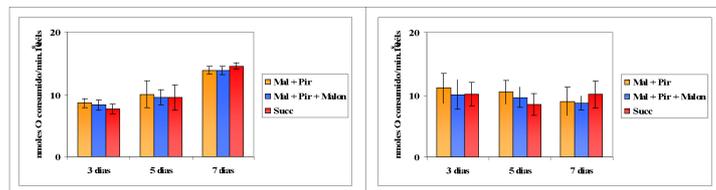


Figura 4: Avaliação da respiração máxima nas cepas Tulahuen 2 (A) e Y (B) ao longo da curva de proliferação. As condições experimentais foram as mesmas da figura 2, adicionando-se 1 μ M CCCP. Análise estatística (t-test): p (1, 2, 3, 4, 5 e 6) < 0,05.

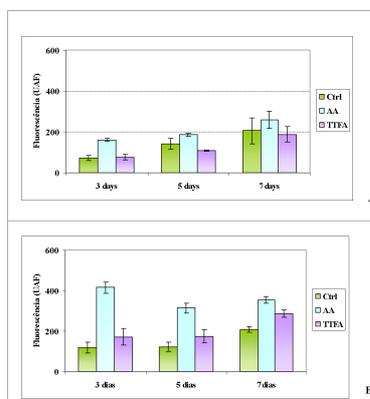


Figura 5: Avaliação da produção de ânion superóxido nas cepas Tulahuen 2 (A) e Y (B) ao longo da curva de proliferação. As condições experimentais estão descritas em material e métodos. Análise estatística (t-test): p (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18) < 0,05.

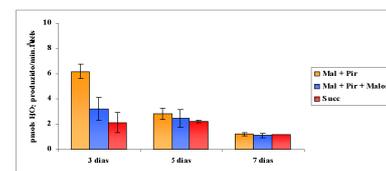


Figura 6: Avaliação da produção de H_2O_2 na cepa Y ao longo da curva de proliferação. As condições experimentais estão descritas em material e métodos. Análise estatística (t-test): p (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16) < 0,05. Através desta metodologia não foi possível detectar o H_2O_2 na outra cepa.

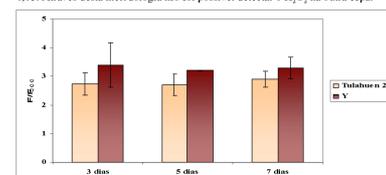


Figura 7: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial nas cepas Y e Tulahuen 2 ao longo da curva de proliferação. As condições experimentais estão descritas em material e métodos. A relação F/F_0 representa o potencial de membrana mitocondrial. Análise estatística (t-test): p > 0,05 para todos os dados analisados.

Conclusão

Considerando-se cada cepa isoladamente não observou-se uma diferença significativa no consumo de oxigênio nos dias de proliferação com os substratos utilizados. Diferenças foram observadas ao longo da curva de proliferação na bioenergética mitocondrial e produção de EROs o que reforça a heterogeneidade da população de *T. cruzi*. Diante dos resultados, uma provável funcionalidade do complexo I da cadeia respiratória de *T. cruzi* foi observada; neste sentido, experimentos estão em andamento com intuito de comprovar esta possibilidade.