



UNICAMP



# Estudo comparativo da bioenergética mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* epimastigotas, contendo ou não, a deleção do gene correspondente a sub-unidade 7 da NADH desidrogenase

Mendonça, M.A.G., Ribeiro, L.H.G. & Gadelha, F.R.  
Depto Bioquímica, IB, UNICAMP

frgad@unicamp.br

## Introdução

As diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* apresentam uma heterogeneidade bastante significativa em suas características biológicas e bioquímicas, que são resultantes de uma alta diversidade genética. Uma explicação para estes fenótipos distintos e a patogênese induzida por *T. cruzi* pode ser a expressão diferenciada de alguns genes.

Usando a técnica do “microarray” para comparar os perfis de transcrição de isolados de humanos assintomáticos com os dos pacientes com problemas cardíacos, o gene de maxicírculo que codifica a subunidade 7 da NADH-desidrogenase (ND7) estava entre os sete sinais expressos de maneira diferente nas duas classes de isolados. O gene ND7 de isolados de pacientes assintomáticos mostrou uma deleção de 455 pb do nt222 ao nt677 da cepa de referência, CL-Brener (Baptista *et al*, Mol and Biochemical Parasitology, 2006 236-248). A lesão em ND7 poderia gerar um produto truncado, que poderia afetar a função mitocondrial do Complexo I da cadeia transportadora de elétrons.

## Objetivo

Análise da bioenergética mitocondrial e a resistência ao estresse oxidativo em diferentes isolados do parasita, contendo ou não a deleção mencionada. Os parâmetros estudados foram a viabilidade celular perante estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, potencial de membrana mitocondrial (células integras e permeabilizadas), produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), consumo de oxigênio e produção de NADPH pela Via das Pentoses Fosfato.

## Materiais e Métodos

### Determinação da citotoxicidade ao peróxido de hidrogênio:

As células ( $5,2 \times 10^6$  cells/mL) foram incubadas na presença de peróxido de hidrogênio (50-150  $\mu$ M) por 30 min e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (Muelas-Serrano *et al*, 2000 Parasitol Res; 86: 999-1002).

### Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial:

O potencial transmembrânico mitocondrial foi analisado por citometria de fluxo usando-se DioC<sub>6</sub>(3) (0.3 nM) como descrito (Campos *et al*, 2004 Biochemical Pharmacology, 2004; 68(11):2197-206).

### Determinação da geração de EROs:

Os epimastigotas ( $1 \times 10^6$  cells/mL) foram incubados em PBS contendo 2  $\mu$ M DHE por 45 min a 28 °C e a produção de EROs foi analisada por citometria de fluxo.

### Determinação do potencial de membrana em células permeabilizadas:

As células ( $1 \times 10^8$  cells/mL) foram tratadas com meio de respiração e as adições pertinentes realizadas ao longo das curvas do experimento. A análise foi feita por fluorescência.

### Determinação da atividade da Via das Pentoses Fosfato:

As células ( $1 \times 10^8$  cells/mL) foram tratadas com tampão Tris-EDTA em presença de triton, inibidor de proteases e substratos. A análise foi feita em espectrofotômetro a 340 nm.

## Resultados

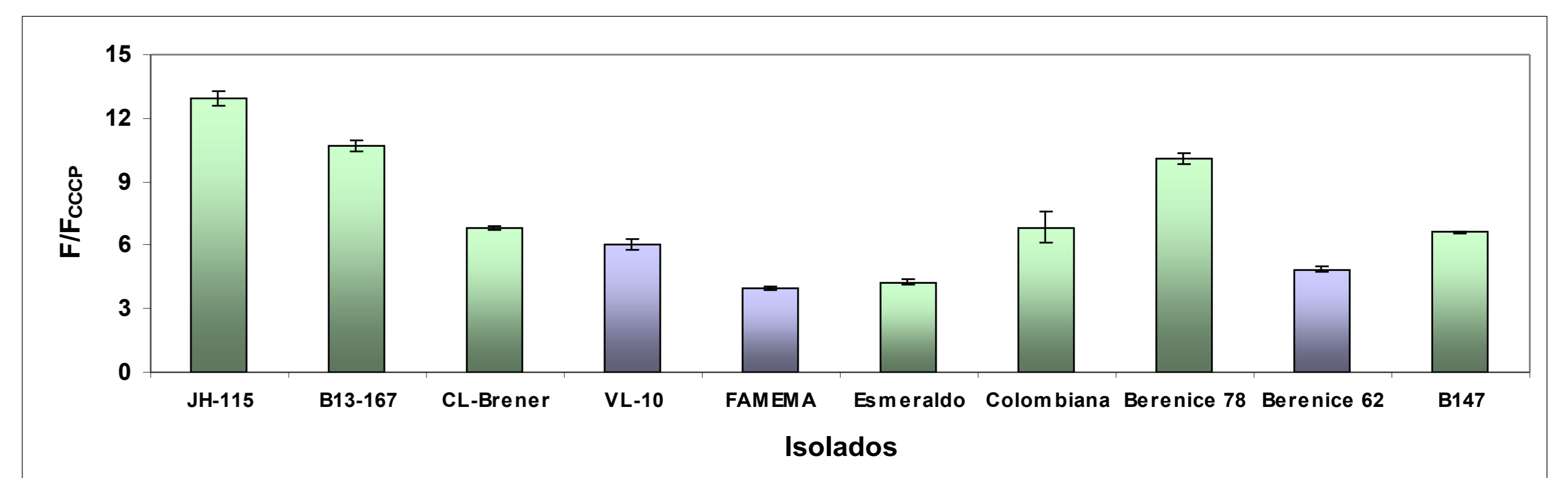


Figura 1 – Determinação do potencial de membrana mitocondrial. As células ( $1 \times 10^6$ /ml) foram incubadas conforme descrito em materiais e métodos e a taxa de fluorescência do DioC<sub>6</sub>(3) na ausência e presença de CCCP foram medidas para estimar mudanças no  $\Delta\Psi$  mitocondrial.

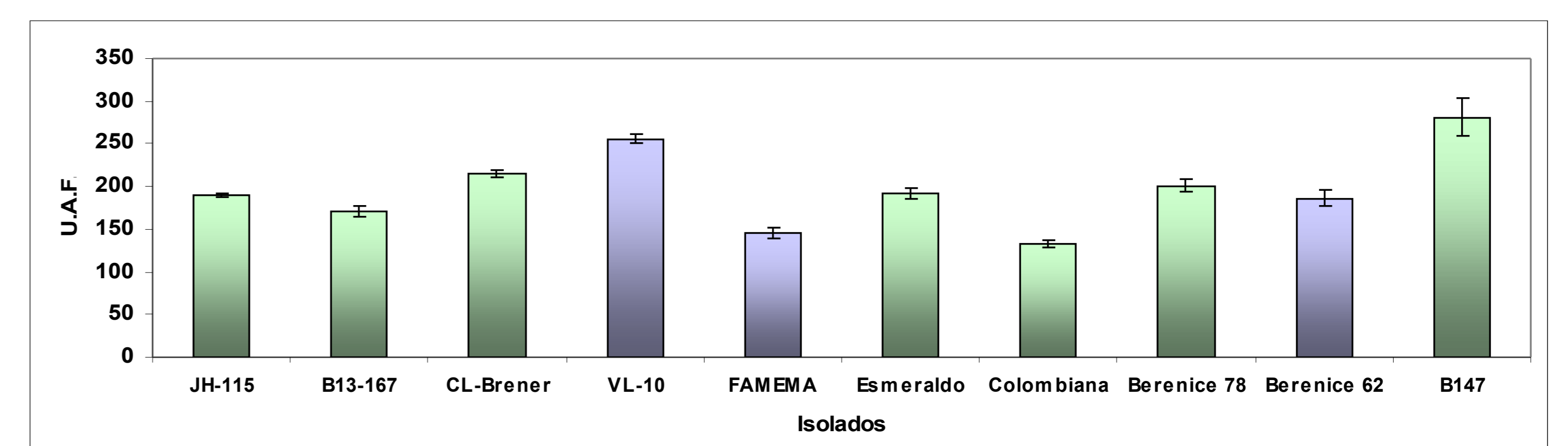


Figura 2 – Determinação da geração de EROs em diferentes isolados do *T. cruzi* – Barras roxas representam a determinação de EROs no grupo com deleção na ND7 e as verdes representam os valores do grupo sem a deleção. Os resultados são dados em média  $\pm$  erro padrão de oito experimentos independentes.

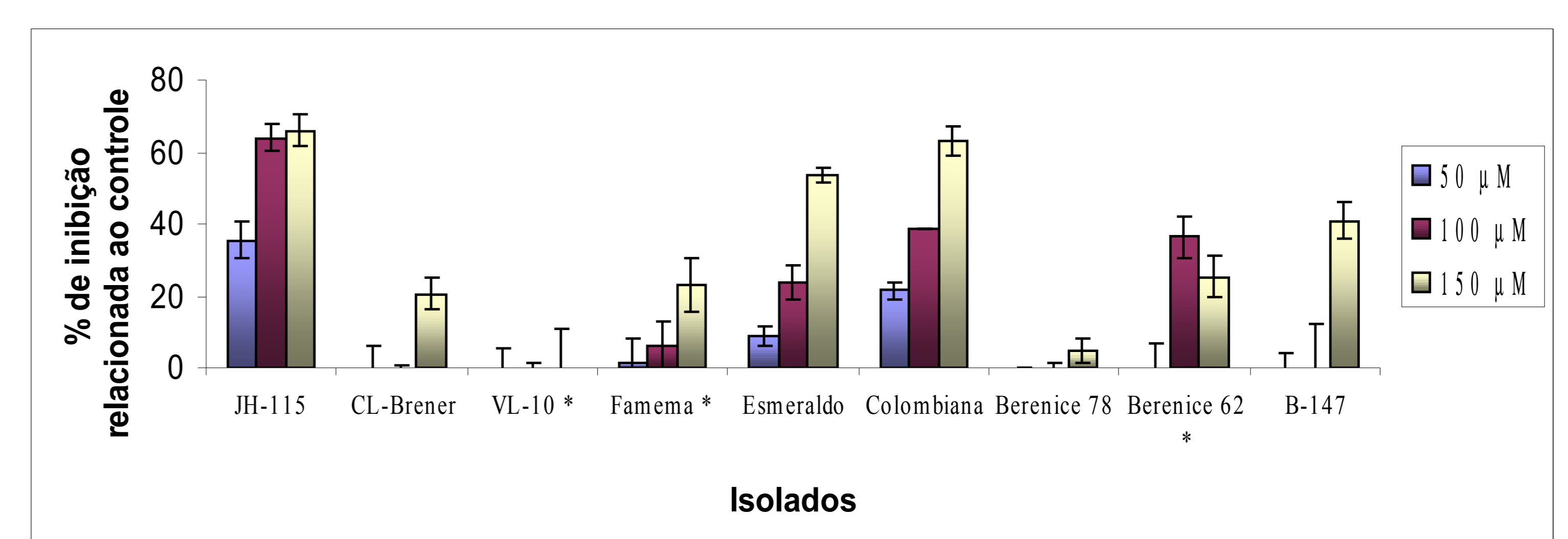


Figura 3 – Determinação da citotoxicidade ao peróxido de hidrogênio. As células foram tratadas por 30 min com peróxido de hidrogênio (50, 100, 150  $\mu$ M) e submetidas ao método do MTT. O (\*) representa os isolados com a deleção. Os dados estão representados como porcentagem de inibição celular relacionada ao controle.

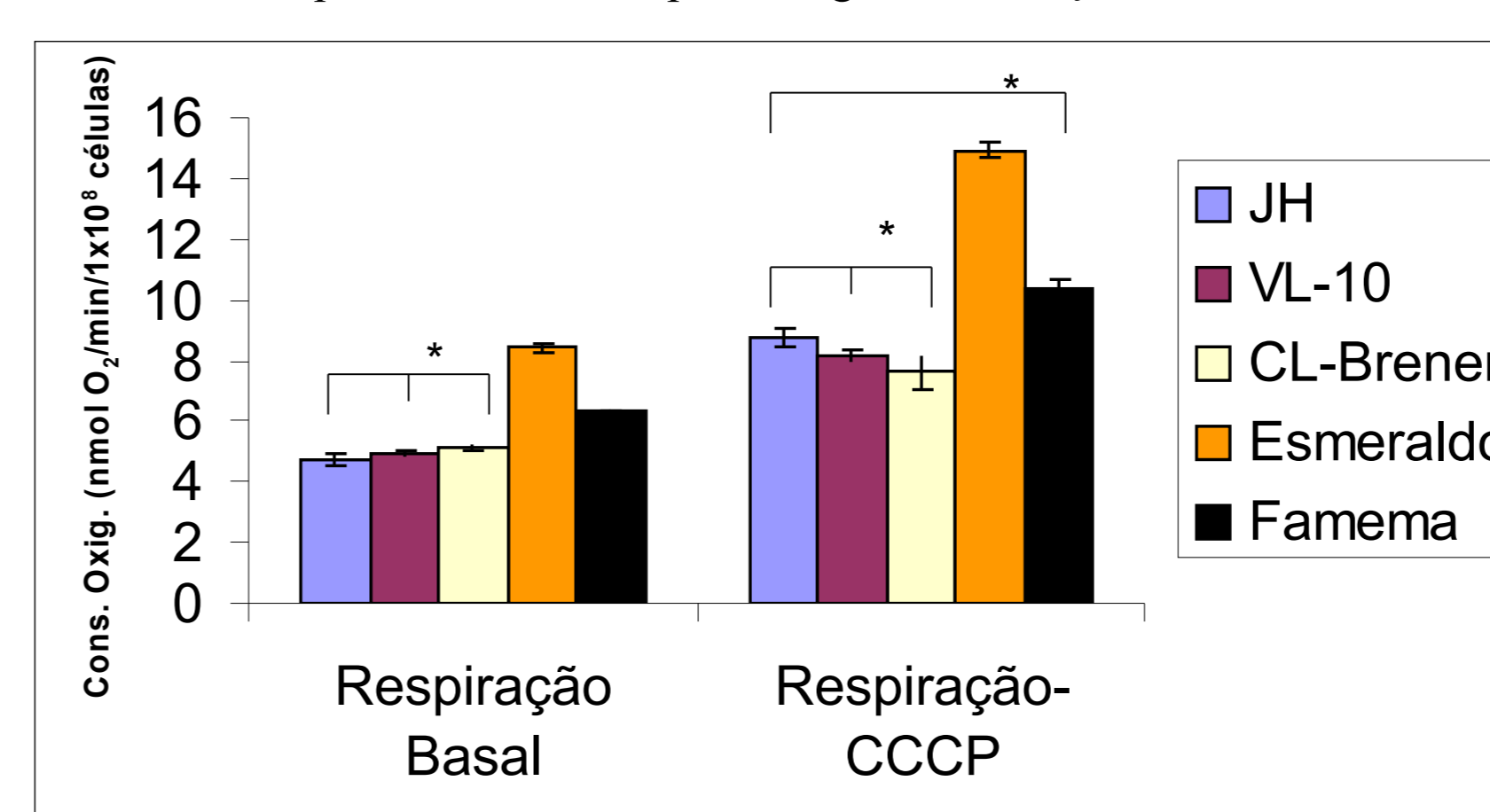


Figura 4 - Determinação do consumo de oxigênio com e sem adição de CCCP. As células ( $1 \times 10^8$  céls/mL) foram incubadas em meio de respiração e a taxa de respiração basal determinada por um eletrodo de Clark na presença (1  $\mu$ M) ou não de CCCP. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Análise estatística *t*-teste  $p > 0,05$ .

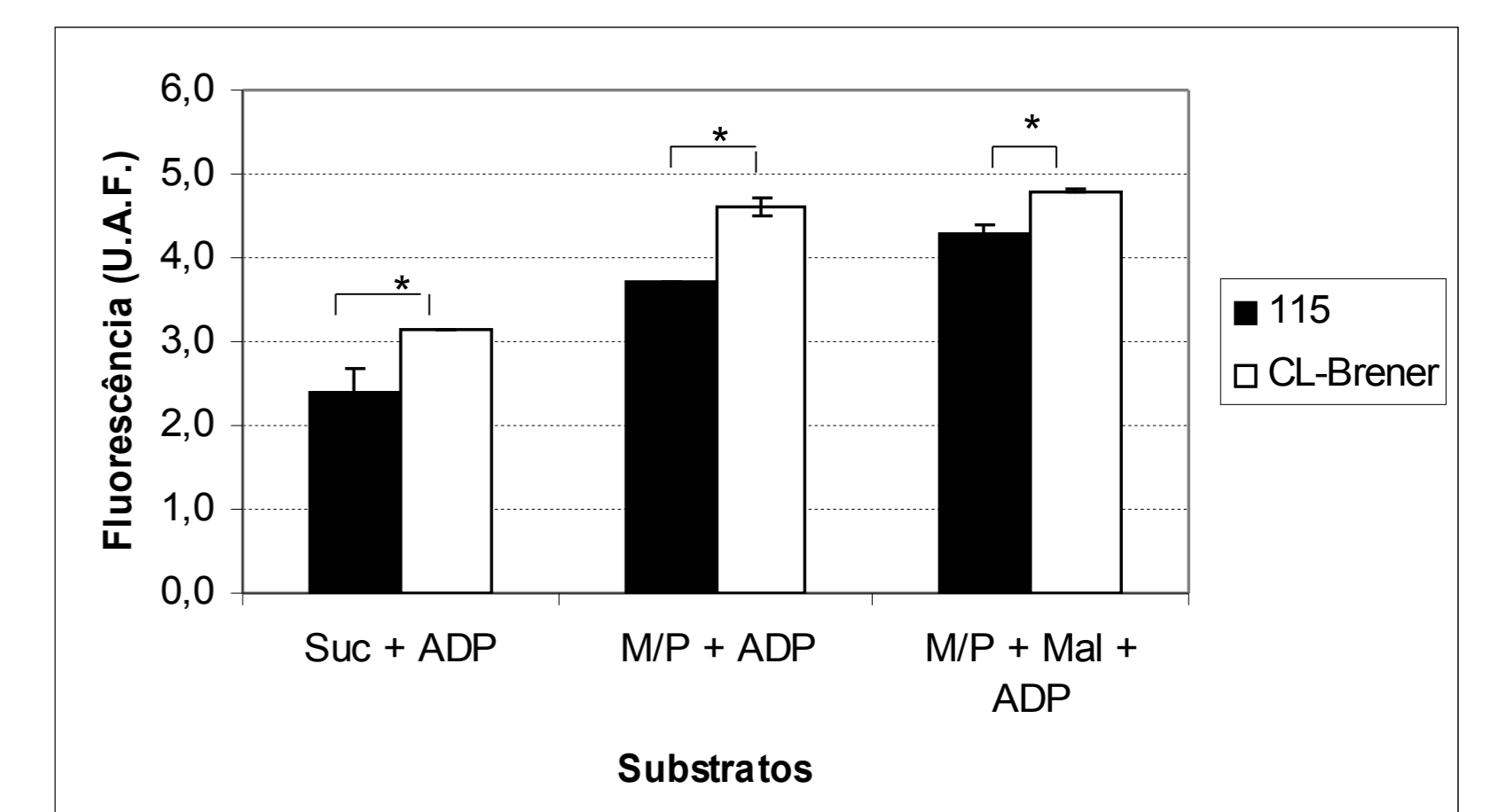
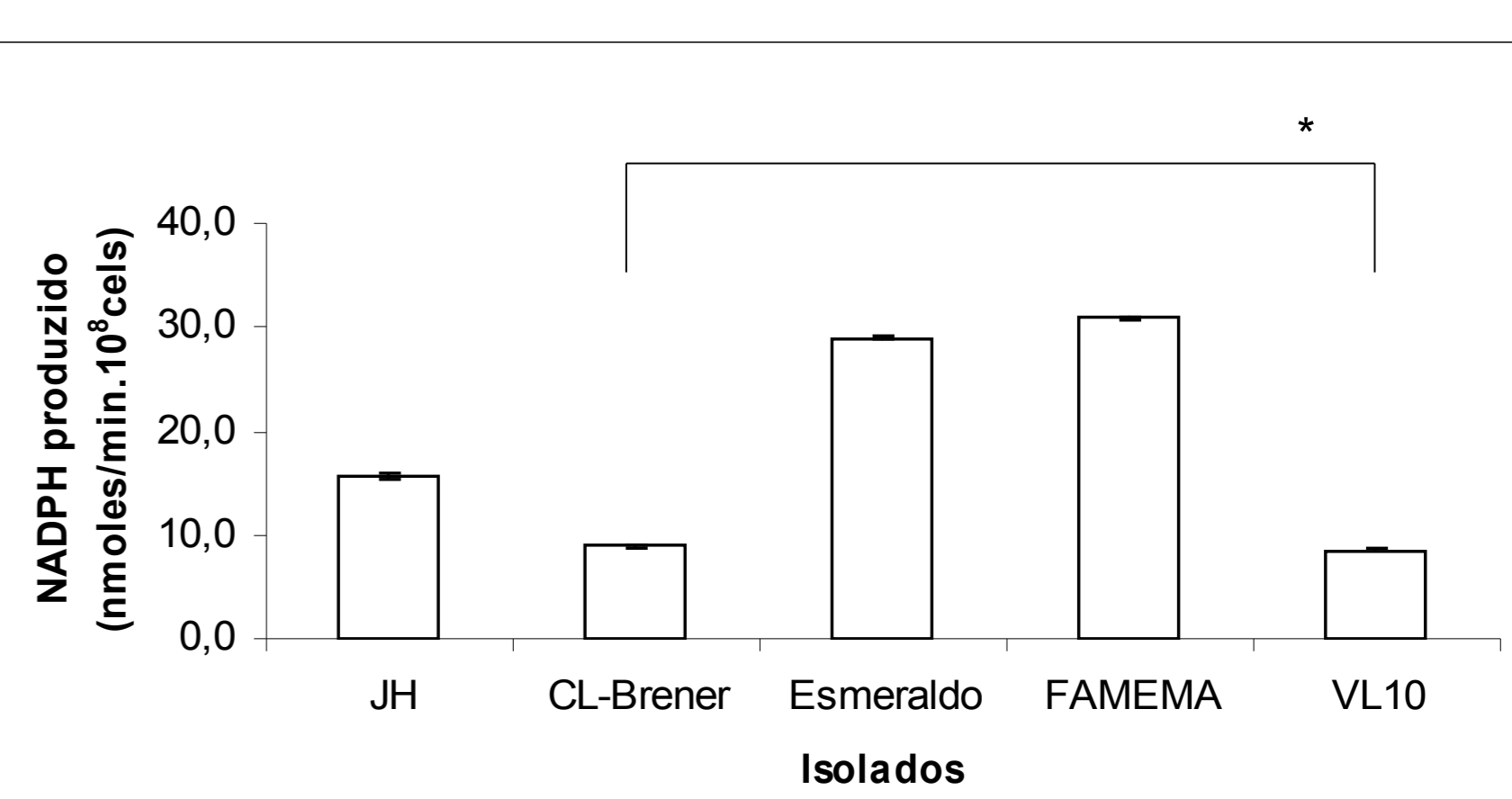


Figura 5 – Potencial de fosforilação em diferentes isolados: as células ( $1 \times 10^8$  cells/mL) foram incubadas em meio de respiração na presença de digitonina (20  $\mu$ M), safranina (5  $\mu$ M), 200 nmoles de ADP e diferentes substratos. Análise estatística \*  $p < 0,05$ .

Figure 6 – Produção de NADPH pela via das pentoses fosfato. As células ( $1.10^8$  cells/ml) foram incubadas em tampão Tris-EDTA na presença de 1 mM de glicose-6-fosfato, 1 mM de 6 fosfogluconato e 250  $\mu$ M de NADP<sup>+</sup>. Análise estatística *t*-test  $p > 0,05$ .



## Conclusão

Sob nossas condições experimentais, nenhuma diferença significativa foi observada entre os parâmetros estudados indicando que a deleção em ND7 não influencia o funcionamento do Complexo I da cadeia transportadora de elétrons do *T. cruzi*.