

ESTUDO DA ATIVIDADE DA VIOLACEÍNA EM *TRYPANOSSOMA CRUZI*

INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP)

Trypanossoma cruzi – Violaceína– Bioenergética mitocondrial

Thays Castelhana de Oliveira
Profa. Fernanda Ramos Gadelha
Financiado por PIBIC-CNPq

Introdução

A violaceína é um metabólito secundário da bactéria *Chromobacterium violaceum* com comprovada atividade antiviral, antibiótica, anti-tumoral e anti-tripanosomatídea. Acredita-se que o mecanismo de ação deste composto esteja relacionado às vias bioenergéticas celulares, porém isto não está muito bem descrito na literatura. Tendo isto em vista, este projeto teve por objetivo estudar os efeitos da violaceína na bioenergética celular e na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em epimastigotas de *Trypanossoma cruzi*.

Materiais e Métodos

Cultura de células

T. cruzi epimastigotas, cepa Y ($5,2 \times 10^6$ células/mL) foram crescidos à 28°C em meio LIT na presença de 10% de soro fetal bovino. Após 3 dias, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em meio de respiração (125 mM sacarose, 65mM KCl, 2mM KH_2PO_4 , 1mM MgCl_2 , 10mM HEPES, 50mg/mL 5% BSA, 0,5mM EGTA a pH=7.2).

Determinação da IC_{50}

As células (5.10^7 células/mL) foram incubadas por 3 dias com as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 μM , a fim de se obter uma curva de crescimento celular. A partir de equações se determinou a IC_{50} (concentração de violaceína em que houve inibição do crescimento celular em 50%).

Determinação do Controle Respiratório:

É feita por medidas de consumo de oxigênio em oxígrafo. Adiciona-se meio de respiração, succinato (5mM), digitonina (40 μM) (controle) e violaceína (tratado) para formar a linha de base. Após dois minutos se adiciona 5×10^7 células/mL. Aos oito minutos são colocados 400 μM de ADP e aos treze minutos 1 $\mu\text{g/mL}$ de oligomicina. O tempo total de ambos os testes é de aproximadamente 15 minutos. O cálculo do controle respiratório é feito pela divisão do estado 3 (logo após adição do ADP) pelo estado 4 (logo após a adição da oligomicina).

Determinação do Potencial de Membrana Mitocondrial

As análises foram feitas em fluorímetro (1). Adiciona-se, na cubeta de quartzo, o meio de respiração, succinato (5mM), safranina (5mM) e as células (5.10^7 cels/mL). Deixa-se formar uma linha base de aproximadamente 200 segundos. Adiciona-se digitonina (40 μM) para que as células sejam permeabilizadas. Para análise do processo de fosforilação coloca-se ADP (400 μM) logo após o alcance do platô pela permeabilização com digitonina ser alcançado. Este estado é revertido com 2 μM de oligomicina. Por fim, adiciona-se CCCP (1,5 μM) para desacoplar a cadeia respiratória.

Determinação da produção de peróxido de hidrogênio

A oxidação do amplex red na presença de HRP (peroxidase) e H_2O_2 gera o resorufin, cuja fluorescência foi monitorada em fluorímetro. Usou-se meio de respiração, succinato (5mM), violaceína (15 μM), digitonina (40 μM), amplex red (50 μM) e HRP (1UI/ml). Assume-se que a quantidade de resorufin formada é igual ao H_2O_2 liberado (2). Os cálculos realizados para saber qual a concentração final de peróxido são feitos pela subtração da curva do controle menos a do background e a curva da violaceína menos a do background. Posteriormente, se aplicam os valores da absorbância obtidos na fórmula $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, e com a substituição dos valores tem-se no fim a concentração de peróxido de hidrogênio.

Resultados e discussão

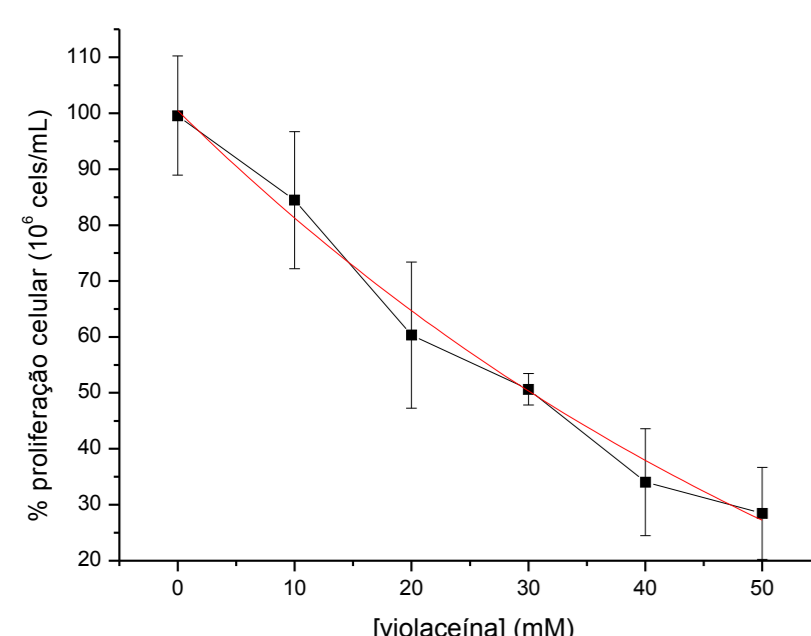


Figura 1. Curva de crescimento celular em epimastigotas de *T. cruzi* (determinação da IC_{50} (linha preta)). Retas logarítmicas usadas na equação para cálculo da IC_{50} (linha vermelha). As células foram incubadas em concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50mM de violaceína.

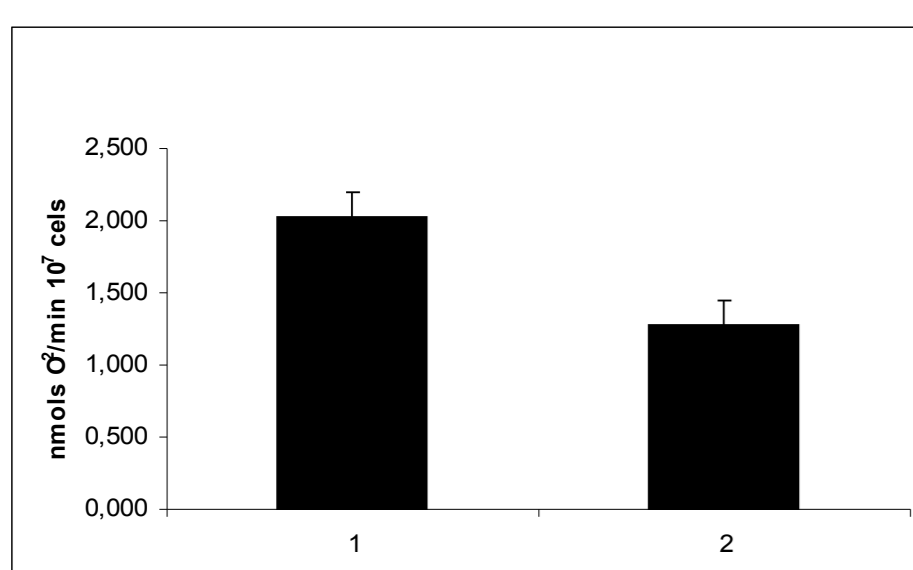


Figura 2. Determinação do controle respiratório em epimastigotas de *T. cruzi*. As células foram ressuspensas em meio de respiração, na ausência (Ctrl) ou presença (Viol) de violaceína. O controle respiratório foi obtido como descrito em materiais em métodos. Análise estatística (t -test) $p < 0,05$.

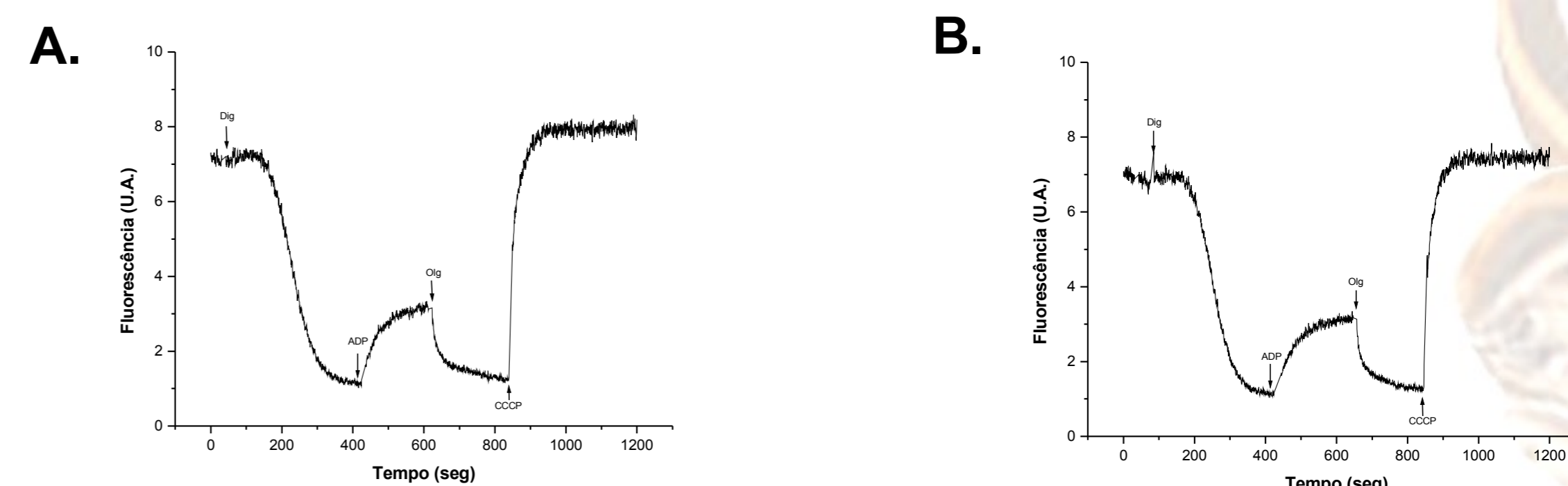


Figura 3. Determinação do potencial de membrana mitocondrial, em epimastigotas de *T. cruzi*. Células (5.10^7 células/mL) foram adicionadas ao meio de respiração contendo safranina (5 μM) e succinato (5mM). ADP (400 μM), oligomicina (2 μM) e CCCP (1,5 μM) foram adicionados nos locais indicados pelas setas. A – Controle e B – na presença de violaceína.

No experimento anterior (Figura 3), a violaceína era adicionada junto ao meio de respiração, succinato e safranina, porém para confirmar sua ação isolada, resolveu-se testar como se comportava a mitocôndria na adição de violaceína após a adição de digitonina.

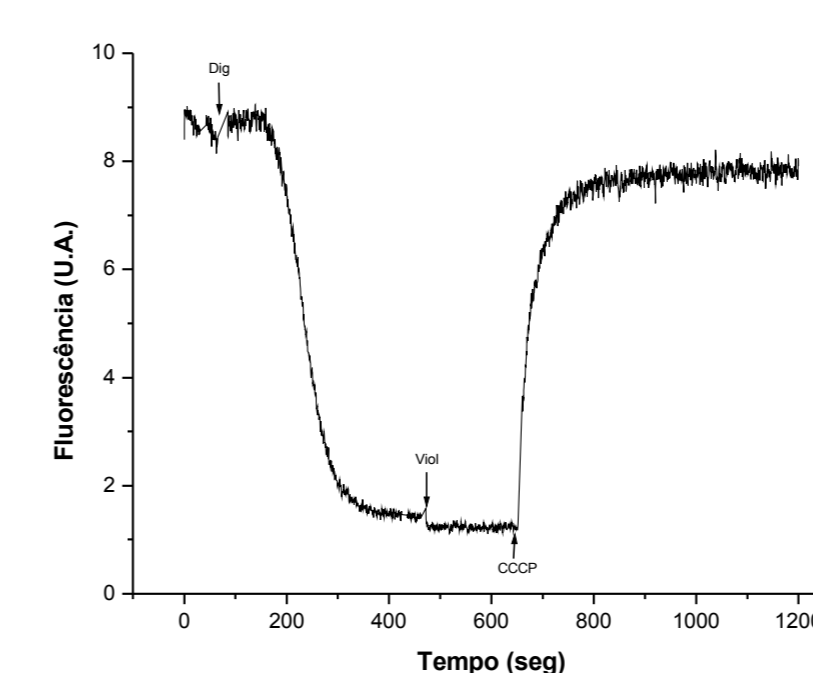


Figura 4. Determinação do potencial de membrana mitocondrial, em epimastigotas de *T. cruzi*. Células (5.10^7 células/mL) foram adicionadas ao meio de respiração contendo safranina (5 μM) e succinato (5mM). Violaceína (15 μM), ADP (400 μM), oligomicina (2 μM) e CCCP (1,5 μM) foram adicionados nos locais indicados pelas setas.

Foi adicionado violaceína inicialmente (junto ao meio de respiração, succinato e safranina) e também logo após a permeabilização pela digitonina, porém em ambos os casos não foram observadas diferenças significativas na adição de violaceína para o potencial de membrana mitocondrial em relação ao controle.

Conforme cálculos, obtivemos uma média de 79,06 pmoles de $\text{H}_2\text{O}_2/5.10^7$ células após a adição de violaceína e 56,22 pmoles de $\text{H}_2\text{O}_2/5.10^7$ células sem a adição de violaceína. Comparando estes resultados não obtivemos diferenças significativas, como é apontado no gráfico abaixo

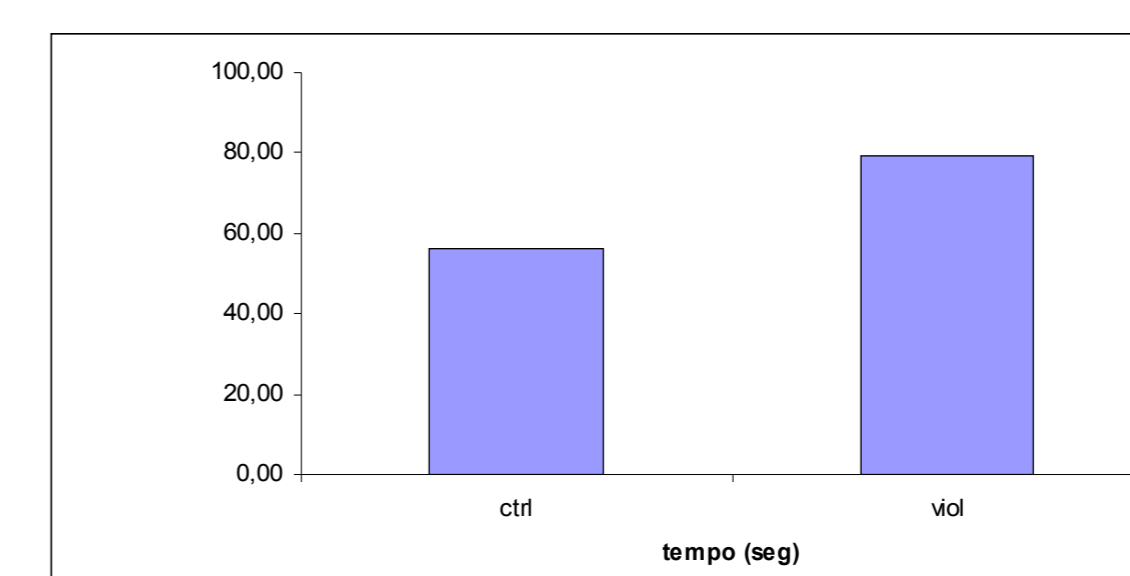


Figura 5. Produção de peróxido de hidrogênio induzido pela violaceína. A produção de peróxido foi calculada como descrito em materiais em métodos. Análise estatística (t -test) $p < 0,05$.

Conclusão

Nos experimentos realizados inicialmente, observou-se que a adição da droga fez o controle respiratório cair bastante (37%), o que nos permite concluir que a maquinaria (complexos I, II, III e IV) da mitocôndria não estava funcionando adequadamente após a adição de violaceína. Ou seja, a mitocôndria sofreu lesão, ou não está íntegra por algum motivo. Tal fato é muito importante, principalmente no caso dos tripanossomatídeos que possuem uma única mitocôndria.

Na análise do potencial de membrana, não houve alteração significativa, indicando que talvez a mitocôndria ainda não esteja tão comprometida, já que o parasita ainda consegue manter o potencial. Quanto a produção de EROs (espécies reativas de oxigênio que são capazes de lesar membranas celulares e até mesmo promover morte celular por este mecanismo os resultados indicam que há um leve aumento na produção de peróxido de hidrogênio (cerca de 25%), se comparadas as células controle. Além dessas análises, são ainda necessários mais estudos sobre seletividade e especificidade da violaceína dentro células do parasita e humanas.

Referências bibliográficas

- (1) Starkov *et al.* Starkov, A.A., Polster B.M. and Fiskum G. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax, *J. Neurochem.* **83** (2002), pp. 220–228.
- (2) Ximenes, V. F. Estudo de novos sistemas quimiluminescentes aplicados na determinação de atividade enzimática. Location: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-06102006-122941/>