

MARIA DE NAZARETH S. LEAL DE MEIRELLES

ESTUDO CITOQUÍMICO DE ENZIMAS MITOCONDRIAS DE Trypanosoma cruzi
EM CULTURAS DE TECIDO.



Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

INSTITUTO DE BIOFÍSICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
1978

A presente tese foi realizada no Laboratório de Ultra-estrutura Celular e Unidade de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biofísica da U.F.R.J. sob a orientação da Dra. Hertha Meyer com os auxílios concedidos pelas seguintes entidades:

Fundação Oswaldo Cruz

Conselho de Ensino para Graduados e Pesquisa da UFRJ
(CEPG)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Financiadora de Estudos e Projetos (FNDCT-375/CT)

À Marcio e nossos sete filhos.

Este trabalho resultou de sua
compreensão, apoio e amor.

À MEMÓRIA DE

Dra. MARYSA DE OLIVEIRA MUSACCHIO

Dr. ANTONIO MOREIRA COUCEIRO

de quem nasceu a idéia deste trabalho e
de cujos estágios iniciais tanto parti-
ciparam.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Dra. HERTHA MEYER, exemplo de firmeza e dedicação ao conhecimento científico. Seus sábios ensinamentos, permanente incentivo e amizade fizeram deste trabalho uma realidade.

Estendemos nossos agradecimentos ao Dr. WANDERLEY DE SOUZA, cujas sugestões e apoio foram decisivos neste trabalho.

Seria difícil enumerar todos os que contribuíram para a realização deste trabalho.

Somos profundamente agradecidos a:

- Prof. Carlos Chagas Filho, cujo permanente interesse muito nos incentivou;
- Dr. W. Lobato Paraense, da Fundação Oswaldo Cruz, pelo inestimável apoio e ajuda constante;
- Dr. Raul D. Machado, pela solicitude e colaboração valiosas;
- Thais Cristina Souto-Padrão, pela ajuda amiga em todas as horas;
- Marlene Benchimol, Tania C. de Araujo Jorge, Teciá Ulisses de Carvalho, Marcia Athias, Paulo F. Pimenta, Marília Taffarel e Silva, Sonia Regina Leite, Wagner Cintra, Adriana Ramalho e Julia Vasconcelos, responsáveis pelo ambiente criativo e amigável do Laboratório;
- Wilson Leon, Fernando S. Cruz, Jayme Angluster, Meciá Maria de Oliveira, por suas oportunas sugestões e esclarecimentos;
- Aderbal Alexandre Alves, pelo valioso auxílio de seus conhecimentos técnicos;
- Antonio L. Oliveira, pela dedicada ajuda técnica fotográfica;
- Marlene da Silva Cazuza, Antonio Bosco Carlos, José Claudio, Sebastião da Cruz pela ajuda técnica;
- Sandra C. de Carvalho e Wanda Lyrio, pelo auxílio na preparação do manuscrito;
- Aos professores e colegas do Laboratório de Histoquímica;
- A todos os professores, colegas, técnicos e funcionários do Instituto de Biofísica;
- À Dra. Célia Monteiro de Castro, pela permissão do estágio na Cultura de Tecidos (Instituto de Biofísica), e a todos os professores, colegas e técnicos da Fundação Oswaldo Cruz;
- Aos professores e colegas do Museu Nacional.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

α GDP	- alfa glicerofosfato desidrogenase
β HBD	- beta hidroxibutirato desidrogenase
DAB	- Diaminobenzidina
DMSO	- Dimethyl sulfoxido
DSNBT	- Dystyryl NitroBlue Tetrazolio
Fig.	- Figura
F	- Flagelo
G	- Complexo de Golgi
ICD	- Isocitrato desidrogenase
C	- Cinetoplasto
KCN	- Cianeto de Potássio
M	- Mitocôndria
N	- Núcleo
NAD	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADI	- Naphtol e dimethyloparaphenylodiamina
NADP	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	- NitroBlue Tetrazolio
OsO_4	- Tetróxido de Ósmio

PROCEDÊNCIA DO MATERIAL UTILIZADO

Acetato de Uranila - Merck (E.Merk, Darmstadt)
Cacodilato de Sódio - TAAB Laboratories
Citrato de Sódio - J.T. Baker Chemical Co., U.S.A.
Cloreto de Magnésio - Merck
DDSA - LADD Research Industries
Diaminobenzidina - Sigma Chemical Co., U.S.A.
Disodioglycerol 3 fosfato - Sigma Chemical Co., U.S.A.
DMD-30 - LADD Research Industries
DMSO - Merck
DSNBT - Polysciences Inc.
Epoxy (Epon 812) - LADD Research Industries
Etanol - Reagen
Formol - Merck
Fosfato de Sódio - Reagen
Glutaraldeído - TAAB Laboratories
Menadione - Sigma Chemical Co., U.S.A.
KCN - BDH Chemicals Ltda Poole, England
Malonato - Sigma Chemical Co., U.S.A.
NAD - Sigma Chemical Co., U.S.A.
NADP - Sigma Chemical Co., U.S.A.
NADPH - Sigma Chemical Co., U.S.A.
NBT - Sigma Chemical Co., U.S.A.
Paraformolaldeído - TAAB Laboratories
Peroxidase (Tipo II) - Sigma Chemical Co., U.S.A.
Sacarose - Merck
Sódio D-3hidroxybutyrato - Sigma Chemical Co., U.S.A.
Succinato de Sódio - Sigma Chemical Co., U.S.A.
Tetróxido de Ósmio - Sigma Chemical Co., U.S.A.
Trisódio DL Isocitrato - Sigma Chemical Co., U.S.A.
Xilol - Reagen

1 - INTRODUÇÃO	8
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	14
Culturas de Tecido	14
Procedimento para Microscopia Ótica e Contraste	
Interferencial Nomarski	14
Métodos Padronizados para enzimas ligadas	15
Procedimento para Microscopia Eletrônica	18
Meios de Incubação	19
3 - RESULTADOS	21
Citocromo Oxidase	21
Succinato Desidrogenase	22
Isocitrato Desidrogenase	23
α Glicerofosfato Desidrogenase	23
β Hidroxibutirato Desidrogenase	24
NADPH Tetrazolio Redutase	24
4 - LEGENDAS	26
5 - DISCUSSÃO	37
6 - CONCLUSÃO	45
7 - SUMÁRIO	47
8 - SUMMARY	48
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

INTRODUÇÃO

O Trypanosoma cruzi, agente da doença de Chagas, possui um ciclo de vida que se passa parte no hospedeiro mamífero e parte no inseto vetor da família Reduviidae. A fase do ciclo no hospedeiro mamífero se realiza no interior das células. Estas células são invadidas pelo parasito na forma tripomastigota que passa a esferomastigota (amastigota) (Meyer & Oliveira, 1948; Meyer e De Souza, 1976) forma que se multiplica por repetidas divisões binárias. Em infecções experimentais de células cultivadas forma-se um grande número de parasitos no interior das células hospedeiras. Quando estas se encontram inteiramente ocupadas pelos esferomastigotas começa a retransformação destes em tripomastigotas. As células hospedeiras são sempre destruídas no fim de cada ciclo, rebentando e liberando os parasitos. Os tripomastigotas liberados podem invadir novas células e iniciar novo ciclo ou, como acontece no organismo, podem cair na corrente sanguínea e, incapazes de divisão, reinvadir novas células. No tubo digestivo do inseto os tripomastigotas ingeridos da corrente sanguínea do hospedeiro mamífero tornam-se epimastigotas ou esferomastigotas (Brack, 1968) que se transformam, por sua vez em tripomastigotas, os chamados tripanosomas metacíclicos, que são infectantes para o hospedeiro mamífero (Chagas, 1909; Dias, 1934; Brack, 1968; Alvarenga, 1974).

Uma das estruturas mais características dos Tripanosomatídeos, partilhada com outros flagelados da ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1964), é o cinetoplasto, situado próximo do corpúsculo basal que dá origem ao flagelo. Quando observado ao microscópio ótico se apresenta em forma de disco ou em barra, conforme a fase em que o parasito se encontra. A forma e o tamanho do cinetoplasto bem como sua posição no corpo podem ser utilizados como critério para identificação do estágio evolutivo, do gênero e da espécie a que pertence um determinado tripanosomatídeo.

Trabalhos feitos em 1916 e 1924 demonstraram que o cinetoplasto se cora in vivo com Verde Janus B (Shipley, 1916) e é Feulgen positivo (Breslau & Scremin, 1924). Estes dados indicam que o cinetoplasto é uma estrutura de natureza mitocondrial

que contem DNA.

A natureza mitocondrial do cinetoplasto que foi também reconhecida meio século atrás pelo protozoologista Alexeieff (1917) foi plenamente confirmada em anos recentes pelos estudos de ultra-estrutura dos tripanosomatídeos. Sabe-se agora que o cinetoplasto se localiza numa parte ligeiramente dilatada da mitocôndria. Frequentemente cristas mitocondriais típicas são encontradas próximo ao cinetoplasto e em muitas micrografias vê-se a continuidade desta região com o restante da mitocôndria (Meyer et al., 1958, Steinert, 1960).

Sabe-se também hoje que o cinetoplasto é formado por um feixe eletrondenso de fibrilas contendo DNA em quantidades muito maiores do que aquelas comumente encontradas em mitocôndrias de outras células.

No Trypanosoma cruzi, durante o seu ciclo evolutivo, o cinetoplasto muda de uma posição pré-nuclear para pós-nuclear, juntamente com o corpúsculo basal e o flagelo. A razão porque estas duas estruturas ficam sempre juntas ainda não está esclarecida.

No Trypanosoma cruzi a organização do cinetoplasto tem sido estudada extensivamente. Em 1968, Brack descreveu fibrilas arranjadas na forma de uma espiral numa contínua fila linear dobrada em forma de 8 podendo várias filas serem unidas para formar uma grande unidade.

O cinetoplasto do Trypanosoma cruzi passa por importantes mudanças no seu ciclo intracelular (Meyer, 1968). Nas formas esferomastigotas (amastigotas) e epimastigotas se apresenta com uma estrutura lamelar eletrondensa. Esta muda, no fim do ciclo, para uma estrutura mais eletrontransparente de forma esférica na qual a curta e comprimida forma lamelar é transformada em longas e irregulares fibras que correm paralelamente e que estão mais afastadas umas das outras. As vezes, apresenta uma forma de cesta (Meyer, 1969). Tanto no fim do ciclo intracelular como nas formas livres que deixaram a célula, o cinetoplasto aparece contínuo com a mitocôndria (Meyer, 1969). A transição do cinetoplasto em forma de disco para a volumosa forma esférica dos tripomastigotas considera-se ser devido à multiplicação das filas de fibrilas e 3 ou 4 filas ordenadas podem estar presentes

(Brack, 1966, Vickerman, 1976). A figura em 8, visível em seções das fibrilas, pode corresponder a um simples minicírculo enrolado de modo que nos tripomastigotas a fileira seriada de fibrilas pode indicar várias camadas de minicírculos empacotados (Simpson, 1972). Recentemente Padrón & De Souza (1978) localizam proteínas básicas na periferia do DNA do cinetoplasto de epimastigotas do Trypanosoma cruzi enquanto que nas formas tripomastigotas foram localizadas em todas as fibrilas do KDNA.

A unidade cinetoplasto-mitocôndria dos tripanosomatídeos tem sido evidenciada tanto pela microscopia em contraste de fase e microscopia eletrônica de cortes seriados como pela citoquímica. Em 1964, Steinert obteve evidência histoquímica com contraste de fase da natureza mitocondrial da forma epimastigota do Trypanosoma mega. Massey em 1960, com NADH tetrazolio Redutase, mostrou uma contínua estrutura ligada com o cinetoplasto. Observações em Leishmania tarentolae, Crithidia luciliae, Crithidia fasciculata (Simpson, 1970) tratados com tampões hipotônicos mostraram que a estrutura semelhante a uma vesícula inchada e esférica representava a mitocôndria inteira da célula. Em 1965, em Trypanosoma brucei e em 1969, em Trypanosoma congolense Vickerman demonstrou por meio da atividade NADH tetrazolio redutase idêntica morfologia mitocondrial em formas tripomastigotas sanguíneas. Em 1975 e 1977, Paulin em microscopia eletrônica de alta voltagem, por meio de cortes seriados e análise estereoscópica comprovou que todos os tripanosomatídeos por ele estudado apresentam uma única mitocôndria.

O condrioma de Crithidia fasciculata (Paulin, 1977) parece ser um retículo ramificado que corre através do citoplasma, os ramos circunscrevem a bolsa flagelar no ápice anterior e abraçam o cinetoplasto. Pequenos nódulos são achados na extensão mitocondrial, porém sua porção ou número não são constantes de célula para célula. Em Blastocrithidia culicis (Paulin, 1975) o condrioma consiste numa massa posterior com seis ramos tubulares que estendem para cima terminando no ápice anterior. O cinetoplasto fica suspenso entre duas das extensões tubulares ou menos frequentemente fazendo saliência como um nódulo de uma das extensões. Na forma epimastigota do Trypanosoma cruzi (Paulin, 1975) a mitocôndria consiste num tubo enrolado de forma triangu-

lar tendo a porção do cinetoplasto como base enquanto o ápice é dirigido no sentido posterior. A mitocôndria se bifurca atrás da bolsa flagelar, lateralmente ao cinetoplasto, enviando duas extensões para o ápice anterior.

Num estudo comparativo do KDNA nas formas de sangue, intracelulares e epimastigotas de cultura de meio acelular, Riou e Gutteridge (1978) verificaram que as propriedades básicas do KDNA em todas as 3 formas são idênticas embora o arranjo do KDNA varie, sendo as diferenças notadamente quantitativas como já descritas anteriormente por outros autores (Brack, 1968, Meyer, 1968, Simpson, 1972).

O Trypanosoma brucei (Vickerman, 1976) apresenta grande pleomorfismo indo de formas tripomastigotas finas para formas curtas e largas que não se dividem. Nas formas finas a mitocôndria é reduzida a um canal periférico quase sem cristas. Os citocromos estão ausentes e o ciclo de Krebs não é funcional. A glicose é incompletamente oxidada a piruvato e o NADH_2 que é produzido na glicólise é reoxidado via Sistema Glicerol-3-Fosfato que é cianeto insensível. A transformação da forma longa para a forma curta é marcada pelo aumento do canal mitocondrial e o desenvolvimento de cristas tubulares. Ao mesmo tempo a mitocôndria adquire piruvato, 2-oxoglutarato oxidase e atividade de NADH tetrazolio redutase sugerindo alguma participação mitocondrial no metabolismo. Após a ingestão do sangue com tripanosomas pela mosca tsé-tsé (*Glossina palpalis*), parecem ser as formas curtas e largas que estabelecem a infecção nos insetos e pensa-se que estas formas são bem adaptadas para as novas condições ambientais no intestino médio, onde a concentração de glicose e tensão de CO_2 são limitadas e os aminoácidos do sangue digerido são abundantes. As formas do intestino médio são muitas vezes olhadas como morfológica e bioquimicamente idênticas às formas que são cultivadas in vitro. Nas formas de cultura há um marca do aumento na capacidade oxidativa, a atividade da prolina oxidase é aumentada impressionantemente e a atividade da succinato oxidase é adquirida. A mitocôndria se apresenta como uma extensa e ramificada rede com cristas típicas. Citocromos são presentes e a respiração é sensível ao cianeto (Vickerman, 1962, Oppenheimer, 1977).

Leishmanias têm ciclos mitocondriais morfológicamente mais simples que os tripanosomas salivares. O sistema mitocondrial dos amastigotas prolifera durante a transformação para promastigotas (Simpson, 1972).

Os tripanosomas *Stercoraria*, parasitos de mamíferos, parecem ter uma mitocôndria normal contendo citocromo com cristas presentes durante todo o ciclo de vida. *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma lewisi*, igualmente mostram cristas típicas e sensibilidade ao cianeto em todos os estágios de vida (Vickerman, 1976).

Estudos bioquímicos preliminares com parasitos isolados (Gutteridge, 1977) têm mostrado que formas de sangue, intracelulares e de cultura acelular de *Trypanosoma cruzi* tem um sistema respiratório que é em parte sensível ao cianeto (70%). Felix et al (1978) em estudos em *Trypanosoma cruzi* de meio acelular acharam uma respiração cianeto insensível e inibida pelo ácido salicilhidroxâmico (SHAM) que varia com a idade da cultura. Os autores, devido ao efeito aditivo da inibição do cianeto e do SHAM nas culturas de 120 horas, sugerem a existência de 2 sistemas de transporte no *Trypanosoma cruzi*, um insensível e outro sensível ao cianeto.

Métodos citoquímicos associados a microscopia ótica e a microscopia eletrônica podem contribuir para a identificação e localização de enzimas. O método citoquímico que utilizamos baseou-se na redução de sais de tetrazolio ou na polimerização oxidativa da diaminobenzidina (DAB). Os sais de tetrazolio são sólidos branco ou amarelo pálido solúveis em água. Eles mudam de cor em reduções fracas e têm sido usados há muito tempo como marcadores quantitativos da atividade das enzimas oxidativas. As reações das enzimas oxidativas envolvem a remoção de hidrogênios (ou eletrons) de um substrato. Estes hidrogênios podem então atuar como agentes redutores para converter sais do tetrazolio em precipitados insolúveis e coloridos chamados de formazanas. Os sais de tetrazolio são caracterizados por um anel heterocíclico contendo 1 C e 4 N, sendo que um dos N é quaternário. Existem dois tipos de sais de tetrazolio: os monotetrazolios com um anel heterocíclico e os ditetrazolios, com dois anéis. Um grande número destes compostos pode ser preparado variando os constitu

intes do anel benzênico (Altman, 1972).

Em 1971, Seligman e colaboradores elaboraram dois novos tipos destes sais que formam compostos eletrondensos: "Thyocarbamil NitroBlue Tetrazolium" (TC NBT) e o "Dystyryl NitroBlue Tetrazolium" (DS NBT). Este último sal foi usado no nosso estudo para a localização das enzimas a nível de microscopia eletrônica. Para a localização a nível ótico usamos o "NitroBlue Tetrazolium" (NBT).

A técnica da diaminobenzidina se tornou um instrumento largamente aceito para a localização da atividade da citocromo oxidase na mitocôndria. A principal propriedade deste composto (DAB) é sua habilidade para se polimerizar quando oxidada originando uma molécula amorfa, insolúvel em água e nos lipídios e que reage rapidamente com o tetróxido de ósmio para formar um complexo chamado de "osmium black".

O objetivo do nosso estudo é de localizar citoquimicamente a atividade de enzimas oxidativas do ciclo de Krebs no Trypanosoma cruzi crescido em células embrionárias de pinto, relacionando-a com os dados bioquímicos já conhecidos bem como verificar a possibilidade do produto da reação ser maior em alguma fase de transformação do parasito localizado no interior da célula hospedeira ou livre no meio de cultura.

Utilizamos o método de cultura de tecido que vem sendo usado rotineiramente desde 1942 no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biofísica da U.F.R.J. para o cultivo de protozoários intracelulares (Romaña, Meyer, 1942; Meyer, Oliveira 1948).

As culturas do músculo cardíaco de embrião de pinto foram infectadas pela cepa Y do Trypanosoma cruzi e, utilizadas para estudos citoquímicos, quando se apresentavam ricas de formas tripomastigotas livres bem como de formas intracelulares em vários estágios do ciclo evolutivo do parasito. Usamos este método porque mantem as células em condições semelhantes às do organismo. O tecido cardíaco continua pulsando e é possível observar in vivo e em preparações fixadas e coradas todas as fases do ciclo intracelular do Trypanosoma cruzi.

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas de Tecido:

Utilizamos miocárdio de embrião de pinto de 9 dias , cortado em fragmentos de 1mm, deixando os pedaços em contato com formas sangüíneas de Trypanosoma cruzi , cepa Y, por uma hora. A p^{ós} a incubação os fragmentos foram lavados em solução de Tyrode e explantados para um coágulo de plasma numa lamínula previamente colocada num tubo de Leighton. Em cima do coágulo foi adicionada uma fase líquida constituída por 7 gotas de Tyrode, 4 de soro de galo inativado e 1 de extrato embrionário. Mudamos a fase líquida duas vezes por semana e esperamos aproximadamente 3 ciclos de parasitismo nestas células, e que corresponde a um período de 10 a 12 dias, ap^{ós} esse tempo interrompemos o cultivo para a fixação das células e posteriormente as incubamos de acordo com técnicas adequadas à localização das diversas enzimas estudadas. A cepa Y vem sendo mantida em nosso laboratório por passagens semanais em camundongo (Silva & Nussenweig, 1953).

Procedimento para Microscopia Ótica e Contraste Interferencial de Nomarski:

Quando as culturas estavam bem parasitadas com células contendo tanto formas esferomastigotas quanto tripomastigotas e quando haviam muitos tripomastigotas livres no meio, interrompemos o cultivo para localização do sítio de atividade das enzimas.

Para microscopia ótica e contraste interferencial (Nomarski) as culturas não foram fixadas previamente. A técnica adotada foi a seguinte:

- 1) Lavagem das culturas em Tyrode durante 30 minutos
- 2) Incubação em meio preparado segundo as técnicas de Pearse (1972). Tempo de incubação de 30 minutos a 1 hora. As culturas são cobertas totalmente pelo meio, podendo-se acrescentar mais meio durante o período de incubação.
- 3) Fixação em formol 15% em salina, durante 15 minutos
- 4) Lavagem em água corrente por 2 minutos
- 5) Lavar bem em água destilada
- 6) Desidratação em etanol (70%, 90% e absoluto), clarificação em

xilol (1:1 e puro) e montagem.

Para microscopia Ótica o meio de montagem foi Permount da Fisher Scientific Company. Para contraste interferencial de Nomarski usamos geléia de glicerina de Roulet como recomendado por Kaiser (1880).

Técnicas:

Geléia de glicerina: dissolver 15g de gelatina branca em 100ml de água destilada e acrescentar 100g de glicerina aquecendo 5 minutos em banho maria. Filtrar a quente através de algodão de vidro. Para cada 100ml da mistura acrescentar 1 gota de fenol (Phenol liquefactum B.P., U.S.P.)

Métodos padronizados para enzimas ligadas (segundo Pearse, 1970).

As modificações introduzidas por nós se relacionaram somente com o tempo de incubação que usamos, quase sempre uma hora e com a temperatura, pois, todas as técnicas foram realizadas a 37°C. (Tabelas I, II e III).

Controle das reações a nível ótico:

Omissão do substrato do meio de incubação ou do sal de tetrazolio, e fervura da cultura durante 5 minutos para inativação das enzimas.

TABELA I

Preparo do Substrato (pH ajustado a 7.0)
Solução Stock

Enzima	Substrato	Quantidade requerida	Vol. H ₂ O (ml)	Neutralização para H ₂ O (ml)
Succinato D	DinaSuccinato 2,5M	6,75g	8	0,05ml NHCl
Isocitrato D	TrinaDLisocitrato 1,0M	2,76g	8	0,9ml NHCl
α Glicerofosfato D	DinaGlicerol3fosfato 1,0M	3,15g	8	0,7ml NHCl
β Hidroxibutirato D	NaD-3 hidroxibutirato 1,0M	1,27g	8	0,15ml NHCl
NADPH D		10mg	8	-

TABELA II

Preparo do Sal de Tetrazolio-NitroBlueTetrazolio
Solução Stock

Nitro BT (4mg/ml)	2,5ml
Tampão Tris (pH 7.4)	2,5ml
MgCl ₂ 5mM	1,0ml
Água destilada	3,0ml

TABELA III

Preparo do Meio de Incubação

Enzima	Vol.Sal de Tetrazolio	Vol. do Substrato	Coenzima
SD	0,9ml	0,1ml	-
IC	0,9ml	0,1ml	NADP 2mg/ml
α GDP	0,9ml	0,1ml	-
β HBD	0,9ml	0,1ml	NAD 2mg/ml
NADPHD	0,9ml	-	NADPH 2mg/ml

Citocromo Oxidase (Seligman et al., 1968)

Diaminobenzidina (DAB)	5mg
Tampão fosfato 0,1M pH 7.4	9ml
Catalase (20 ug/ml)	1ml
Citocromo C	10mg
Sacarose	750mg

Procedimento para Microscopia Eletrônica:

- 1) Lavagem das culturas em Tyrode durante 30 minutos
- 2) Fixação num dos seguintes meios:
 - a) Glutaraldeído 2,5% em Tyrode - 15 ou 30 minutos
 - b) Paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0.1M, pH 7.4 - 10 minutos
 - c) Glutaraldeído 1% - Paraformaldeído 1% em Tampão Fosfato 0.1M pH 7.4 Karnovsky (1965) modificado - 10 minutos
 - d) Fixação em Glutaraldeído 2,5% em Tampão Fosfato 0.1M pH 7.4 - 30 minutos após incubação no meio para detecção da enzima.

Em todos os tipos de fixação foi acrescentado 7% de sacarose para manutenção da osmolaridade. Em algumas enzimas, foi também usado o Tampão Cacodilato 0.1M pH 7.2.

- 3) Incubação no sistema adequado para revelação da enzima (abaixo relacionado) a 37°C durante 1 hora.
- 4) Lavagem 3 vezes durante 5 minutos em Tampão Fosfato 0.1M pH 7.4 mais sacarose 0.2M
- 5) Pós-fixação em Tampão fosfato 0.2M e OsO₄ 0.2M durante 90 minutos (pode ser 60 minutos) a 4°C.
- 6) Lavagem em Tampão Fosfato 0.1M
- 7) Desidratação em acetona (50%, 70%, 90%, Absoluta 2 vezes)
- 8) Inclusão em Epon (Luft, 1961)

Os cortes ultrafinos foram obtidos num ultramicrotomo LKB. Para facilitar a identificação dos componentes celulares e a focalização do material, os cortes foram corados 2 minutos em citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e observados num microscópio eletrônico AEI EM6-B operando com 60 KV.

Os meios de incubação foram preparados segundo Seligman et al (1971), Brunk & Ericsson (1972) e Spector (1975).

Meios de Incubação

Citocromo Oxidase (E.C. 1.9.3.1) (Seligman et al., 1968)

Método I

Tampão Cacodilato 0.1M pH 7.2	10ml
Diaminobenzidina (DAB)	10mg
Herseeradish Peroxidase (Type II)	5mg
Sacarose	750mg

Método II

Tampão Cacodilato 0.1M pH 7.2	9ml
DAB	5mg
Catalase 20ug/ml	1ml
Citocromo C	10mg
Sacarose	750mg
Inibidor: 0.01M Cianeto de Potássio (KCN) adicionado ao meio de incubação	

Succinato Desidrogenase SDH (E.C. 1.3.99.1) (Spector, 1975)

Tampão fosfato 0.1M pH 7.4	9,5ml
Succinato de Sódio	80mg
Dystyryl NitroBlue Tetrazolium (DSNBT)	10mg
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	0,5ml
Sacarose	750mg
Inibidor: 0.05M Malonato adicionado ao meio de incubação	

Isocitrato Desidrogenase ICD (E.C. 1.1.42) Pearse (1970) modificado.

Tampão fosfato 0.1M pH 7.4	9ml
TriNa DL Isocitrato	2,76g
Nicotinamida AdeninaDinucleotideo	
Fosfato (NADP)	20mg
Cloreto de Mg ($MgCl_2$) 5mM	1ml
DSNBT	10mg
DMSO	0,5ml
Sacarose	750mg
Controle: Omissão de substrato específico	

α Glicerofosfato Desidrogenase GDP (E.C. 1.1.2.1) Pearse (1970)mo
dificado

Tampão fosfato 0.1M pH 7.4 9,5ml

DiNa glycerol 3 fosfato 3,15g

DSNBT 10mg

Menadione 50mg

DMSO 0,5ml

Sacarose 750mg

Controle: Omissão de substrato específico.

β Hidroxibutirato Desidrogenase HBD (E.C. 1.1.1.30) Pearse (1970)
modificado

Tampão fosfato 0.1M pH 7.4 8,5ml

Na-D-3hydroxybutyrate 1,27g

NAD 20mg

DSNBT 10mg

DMSO 0,5ml

MgCl₂ 5mM 1,0ml

Sacarose 750mg

Controle: Omissão do substrato específico

NADPH Tetrazolio Redutase NADPH Diaforase (Seligman et al, 1971)

Tampão fosfato 0.1M pH 7.4 10ml

NADPH 20mg

DSNBT 10mg

DMSO 0,5ml

Sacarose 750mg

Controle: Omissão de substrato específico.

RESULTADOS

Para verificarmos as atividades das enzimas nas células e nos parasitos, foram fixadas culturas ricamente parasitadas com formas intracelulares e livres.

Preparações fixadas pelo método comum, Bouin e Giemsa (fig. 1) mostram apenas os componentes celulares mais conhecidos, tais como membrana, citoplasma, núcleo e cinetoplasto mas, não mostram mitocôndrias. Micrografias obtidas de cortes ultrafinos e contrastadas pelo acetato de uranila (30 minutos) e citrato de chumbo (5 minutos) (fig. 2) ou apenas contrastadas pelo citrato de chumbo (2 minutos) (fig. 3 e 4) não mostram nas mitocôndrias contraste maior do que o obtido nas outras membranas celulares.

Nas preparações em que revelamos o sítio de atividade das enzimas, referidas em Materiais e Métodos, nota-se uma grande diferença nos resultados obtidos. Utilizamos uma contrastação de apenas 2 minutos em citrato de chumbo, para facilitar a focalização e identificação dos componentes celulares no nosso material.

No esquema I apresentamos uma visão geral da estrutura das formas esferomastigotas e tripomastigotas do T. cruzi bem como a distribuição da mitocôndria ao longo do corpo do parasito. No esquema II_a apresentamos uma visão geral da cadeia transportadora de eletrons assinalando a participação das enzimas estudadas. No Esquema II_b apresentamos a localização topográfica das enzimas estudadas na mitocôndria.

Citocromo Oxidase (E.C. 1.9.3.1)

A reação para Citocromo Oxidase revelou-se muito intensa, dando um contraste visível tanto em nível ótico como ultra-estrutural, nas células de miocárdio parasitadas ou não pelo Trypanosoma cruzi bem como nos parasitos intracelulares e nos liberados no meio de cultura. A técnica usada, descrita em Materiais e Métodos fez uso da diaminobenzidina (DAB) como doador de hidrogênio da reação e marcador da atividade da enzima. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de Tampão cacodilato 0.1M pH 7.2 tanto na fixação como no meio de incubação.

Nível Ótico: Pequenos grãos de cor marron foram encontrados em volta do núcleo das células ou rodeando os parasitos em todo o citoplasma disponível na célula parasitada (fig. 5). No interior dos parasitos, tanto intracelulares como nos livres, a reação se revela bem mais fraca. Com o cianeto de potássio a reação foi totalmente inibida (fig. 6).

Nível ultra-estrutural: O produto eletrôn-denso se localiza intensamente nas mitocôndrias da célula hospedeira, nas regiões das cristas e membrana interna (fig. 7). Nas formas esferomastigotas e epimastigotas e nas livres no meio a reação é também muito forte localizando-se nas cristas e membrana interna em todas as regiões da mitocôndria do corpo celular do parasito (figs. 8-10).

Controle: Esta reação foi inibida por 0.01M de Cianeto de Potássio (KCN) adicionado ao meio de incubação.

Succinato Desidrogenase (E.C. 1.3.99.1)

Em células de miocárdio parasitadas pelo T. cruzi localizamos esta enzima a nível ótico e eletrônico. A melhor localização do sítio de atividade da enzima foi obtida com a fixação de glutaraldeído a 1% e Paraformolaldeído a 1% em Tampão fosfato 0.1M pH 7.4, a temperatura ambiente.

Localização a nível Ótico: As células apresentam intensa reação ao redor do núcleo. Nas células parasitadas grãos de cor azul foram observados em todo o espaço citoplasmático útil (figs. 11-12). Nas formas intracelulares esferomastigotas e epimastigotas a reação se apresenta na forma de 5, 6 ou 7 grãos azuis (fig. 13) e nos tripanosomas livres aproximadamente de 8 a 15 grãos (figs. 14-17). Uma melhor visualização foi obtida quando utilizamos o método de contraste de amplitude associado ao contraste interferencial de Nomarski (Allen et al., 1969) tendo-se obtido idêntico resultado no estudo das demais enzimas.

Localização a nível ultra-estrutural: A nível ultra-estrutural a reação não foi tão evidente quanto aquela encontrada com a citocromo oxidase. O produto eletrondenso se localiza numa reação moderada tanto na célula hospedeira quanto no parasito. Nas células hospedeiras a reação se revela na membrana interna e nas

cristas mitocondriais. Nos parasitos intracelulares e nos liberados no meio a reação é observada na membrana interna e nas cristas em todas as regiões da mitocôndria do corpo celular (figs 18-20).

Controle: Esta reação foi inibida por 0.05M de Malonato adicionado ao meio de incubação.

Isocitrato Desidrogenase (E.C. 1.1.1.42)

A Isocitrato desidrogenase foi facilmente revelada a nível ótico e eletrônico porque apresenta uma reação mitocondrial intensa. Como melhor método de fixação utilizamos glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0.1M pH 7.4 durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Nível ótico: Uma reação muito forte é encontrada na forma de grãos azuis em células normais ou parasitadas pelo Trypanosoma cruzi, em volta do núcleo ou dos parasitos e ocupando o citoplasma disponível da célula parasitada (figs. 21, 23, 26). Nas formas intracelulares esferomastigotas e epimastigotas a reação se revela na forma de 5-8 grãos (figs. 22-24) e nos tripomastigotas de cultura, cerca de 8 a 15 grãos azuis ao longo do corpo de parasito (fig. 25).

Nível ultra-estrutural: O produto eletrôn-denso é localizado na membrana interna e nas cristas mitocondriais das células normais ou parasitadas. Nos parasitos intracelulares e nos liberados no meio a reação muito intensa é vista nas cristas e na membrana interna de toda a mitocôndria (figs. 27-29).

Controle: Com a omissão do substrato específico no meio de incubação não se observou reação.

α Glicerofosfato Desidrogenase (E.C. 1.1.2.1)

A melhor evidenciação do sítio de atividade da enzima foi obtida com a fixação em glutaraldeído a 1% e paraformaldeído a 1% em tampão fosfato 0.1M pH 7.4 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Menadione (Vitamina K3) foi acrescentado ao meio de incubação agindo como acceptor intermediário dos elétrons na reação.

Nível ótico: Uma reação moderada ao redor do núcleo das células parasitadas ou não pelo Trypanosoma cruzi e em volta dos parasitos intracelulares foi observada (figs. 30, 32). No interior das formas intracelulares são notados 5-7 grãos para as formas esferomastigotas (fig. 31).

Nível ultra-estrutural: O produto eletrôn-denso se localiza tipicamente na membrana interna da mitocôndria das células hospedeiras e nos parasitos intracelulares bem como nos liberados no meio. Poucas cristas apresentaram reação (figs. 33-34). O sítio de atividade da enzima parece ser mais de superfície externa de membrana interna mitocondrial e a reação não é muito intensa.

Controle: Com omissão de substrato específico no meio de incubação não se observou produto de reação.

β -Hidroxibutirato Desidrogenase (E.C. 1.1.30)

Os melhores resultados foram obtidos com a fixação em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0.1M pH 7.4 durante 15 minutos a temperatura ambiente e acrescentando 5mM de $MgCl_2$ ao meio de incubação.

Nível ótico: Uma reação moderada foi observada em volta do núcleo das células não parasitadas, em volta das formas intracelulares e em todo o citoplasma útil da célula hospedeira. Nos parasitos intracelulares a reação se revela bem mais fraca. Em contraste interferencial de Nomarski uma melhor visualização da reação foi obtida (fig. 35).

Nível ultra-estrutural: A reação mitocondrial se revela fortemente na membrana interna. Poucas cristas apresentam reação. O sítio ativo desta enzima está localizado na face mais externa da membrana mitocondrial interna voltada para a membrana externa da mitocôndria (figs. 36-37). Nas células hospedeiras a reação é moderada e se localiza tanto na membrana interna como nas cristas mitocondriais.

Controle: Com a omissão do substrato específico ao meio de incubação não se observou reação.

NADPH Tetrazolio Redutase (NADPH DIAFORASE).

Na revelação desta enzima os melhores resultados fo

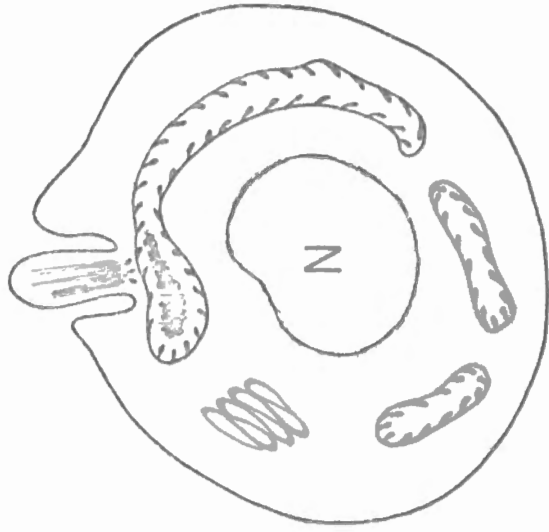
ram obtidos com uma fixação de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0.1M, pH 7.4 a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Nível Ótico: Uma reação intensa localizada ao redor do núcleo e dos parasitos intracelulares bem como no citoplasma das células normais (figs. 38-39). Nas formas esferomastigotas e epimastigotas a presença de 5-7 grãos revela a região da mitocôndria dos parasitos (figs. 38, 39). E 8 a 15 grãos de cor azul foram observados nas formas tripomastigotas (fig. 40).

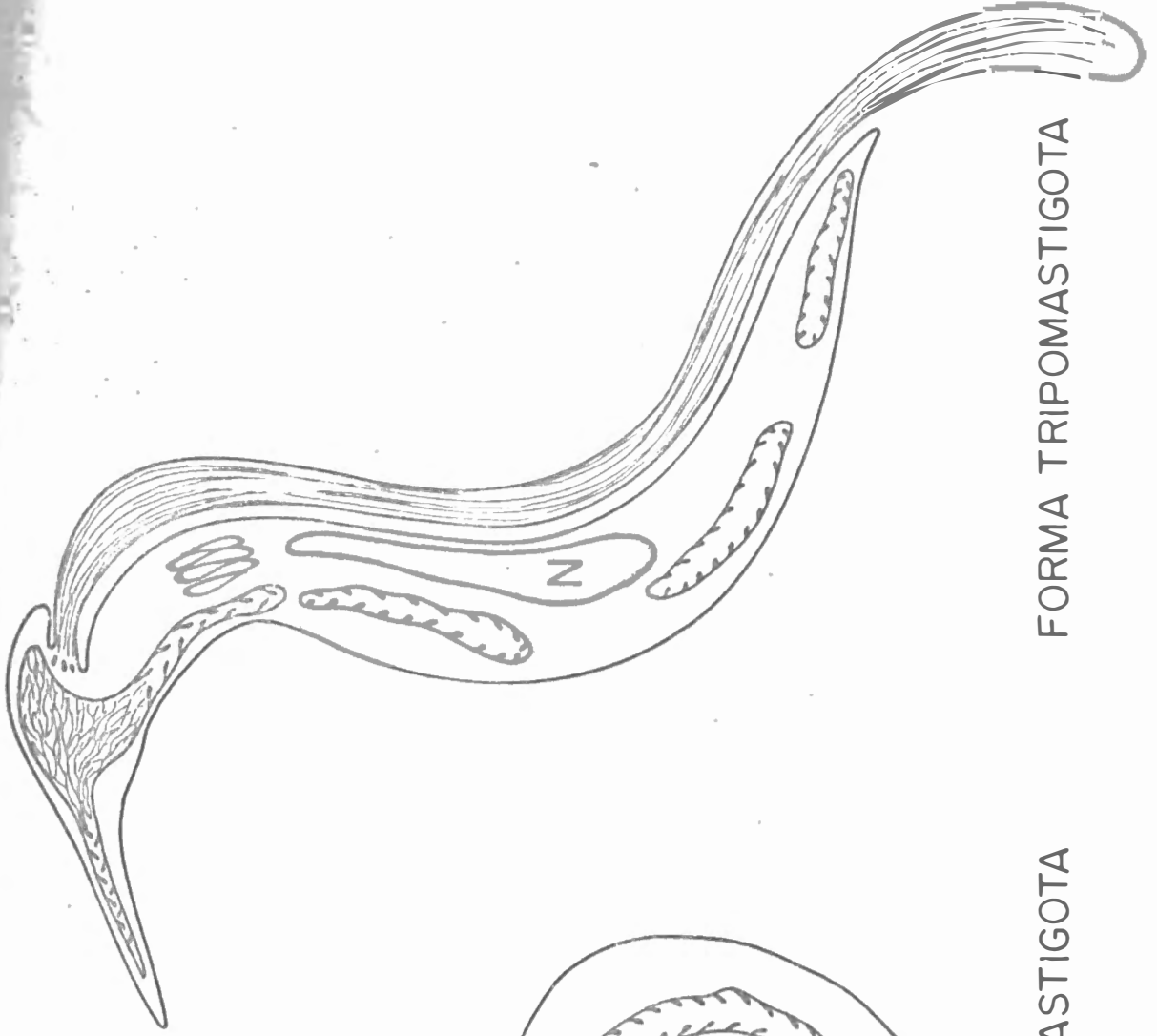
Nível ultra-estrutural: O produto eletrondenso foi observado nas cristas e na membrana interna mitocondriais da célula hospedeira indicando uma intensa reação. Nos parasitos intracelulares e nos livres no meio a reação é vista nas cristas e na membrana interna de todas as regiões da mitocôndria (figs. 41-43).

Controle: Com omissão da coenzima reduzida ao meio de incubação não se observou reação.

Esquema I

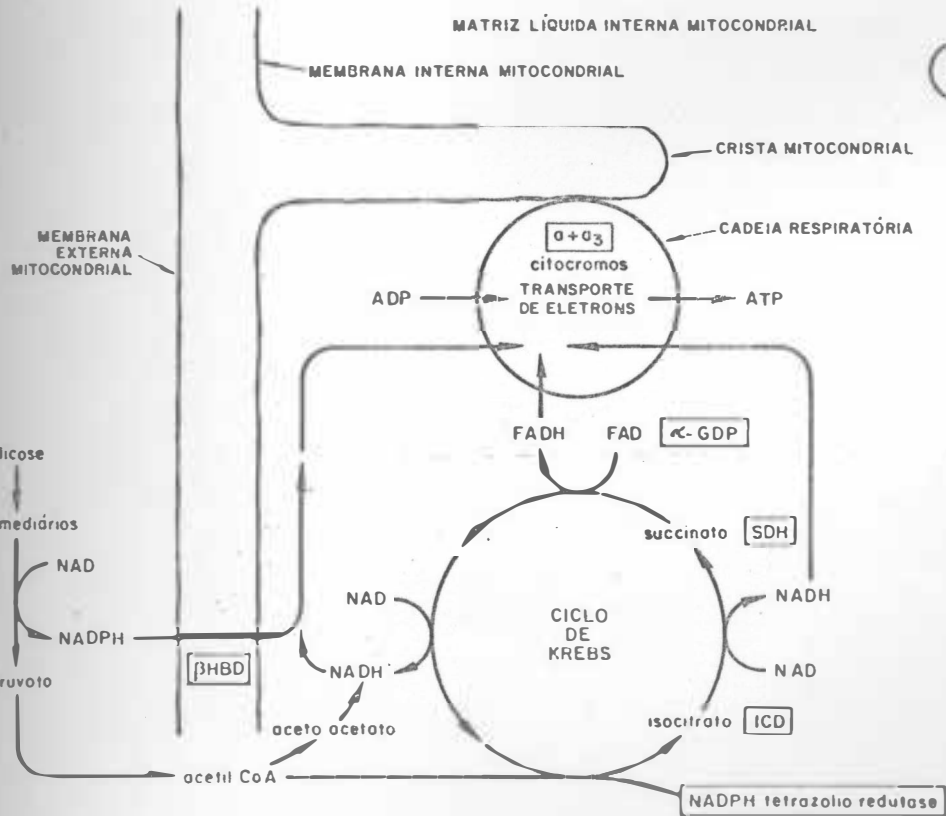
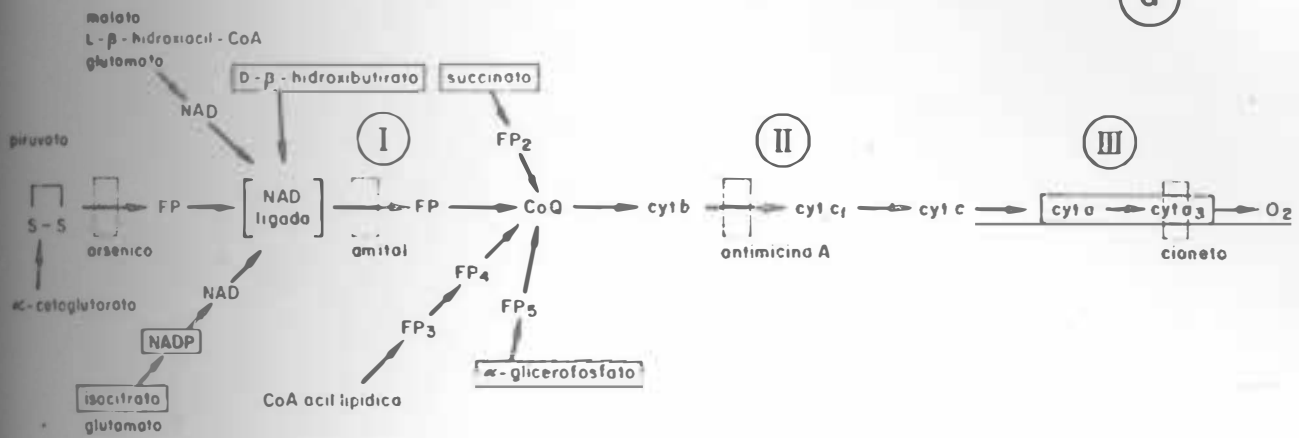


FORMA ESFEROMASTIGOTA



FORMA TRIPOMASTIGOTA

Esquema II



LEGENDAS

Fig. 1 - Células de miocárdio com 12 dias de cultivo fixadas em BOUIN e coradas com GIEMSA. Cultura ricamente parasitada apresentando formas esferomastigotas em divisão (↓). Núcleo (N). X 1800

Fig. 2 - Corte fino de uma célula contendo dois parasitos, contrastada com Acetato de Uranila e Citrato de Chumbo. Todas as estruturas membranosas mostram o mesmo contraste. X 30000

Figs. 3 e 4 - Parasitos intracelulares, contrastados apenas durante dois minutos com citrato de Chumbo para facilitar a visualização do material. As estruturas não se apresentam contrastadas. Cinetoplasto (C) fig. 3; Mitocôndria (M) fig. 4; fig. 3 - X 30000; fig. 4 - X 30000

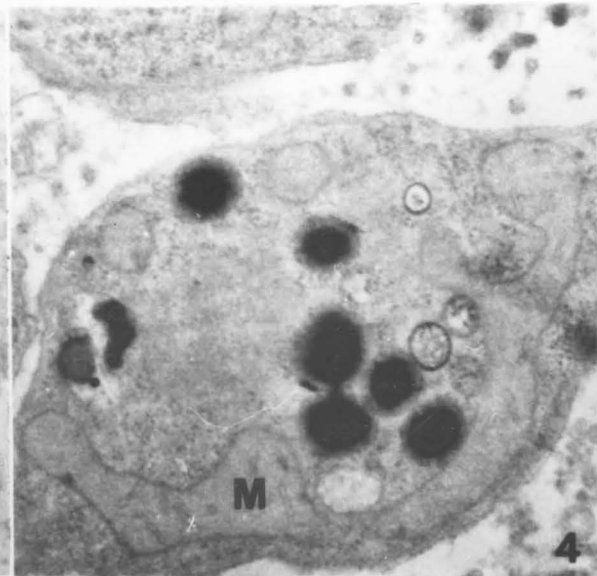
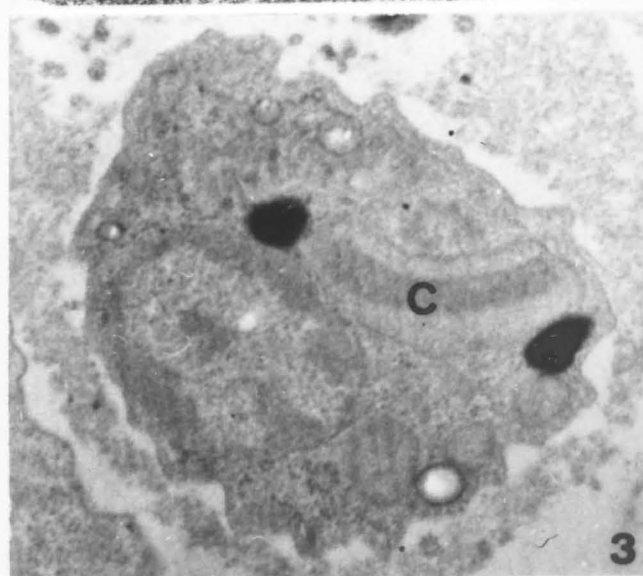
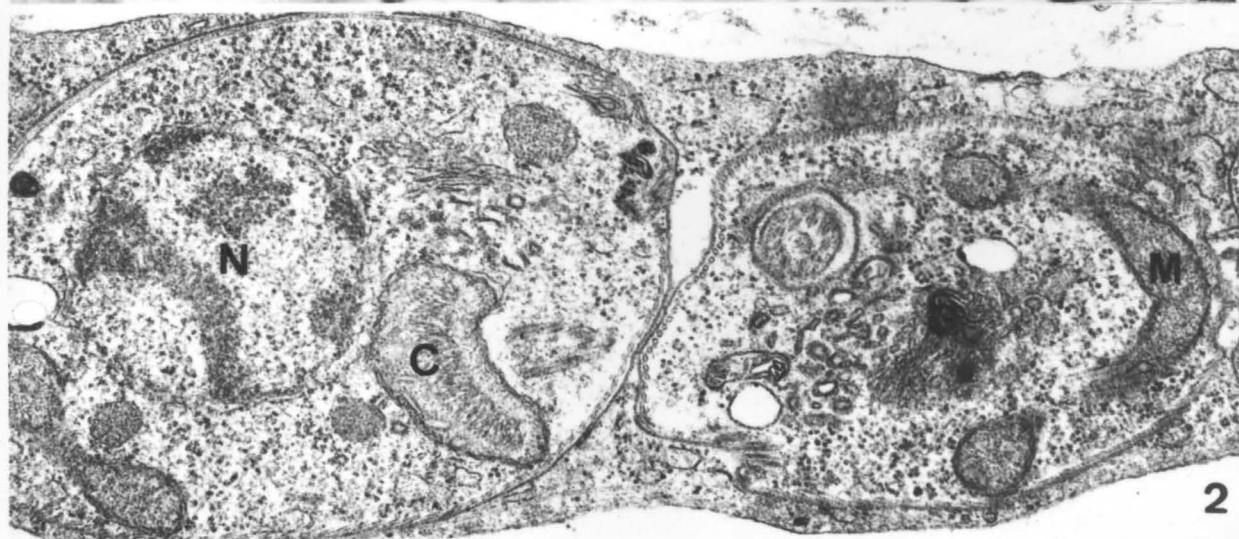
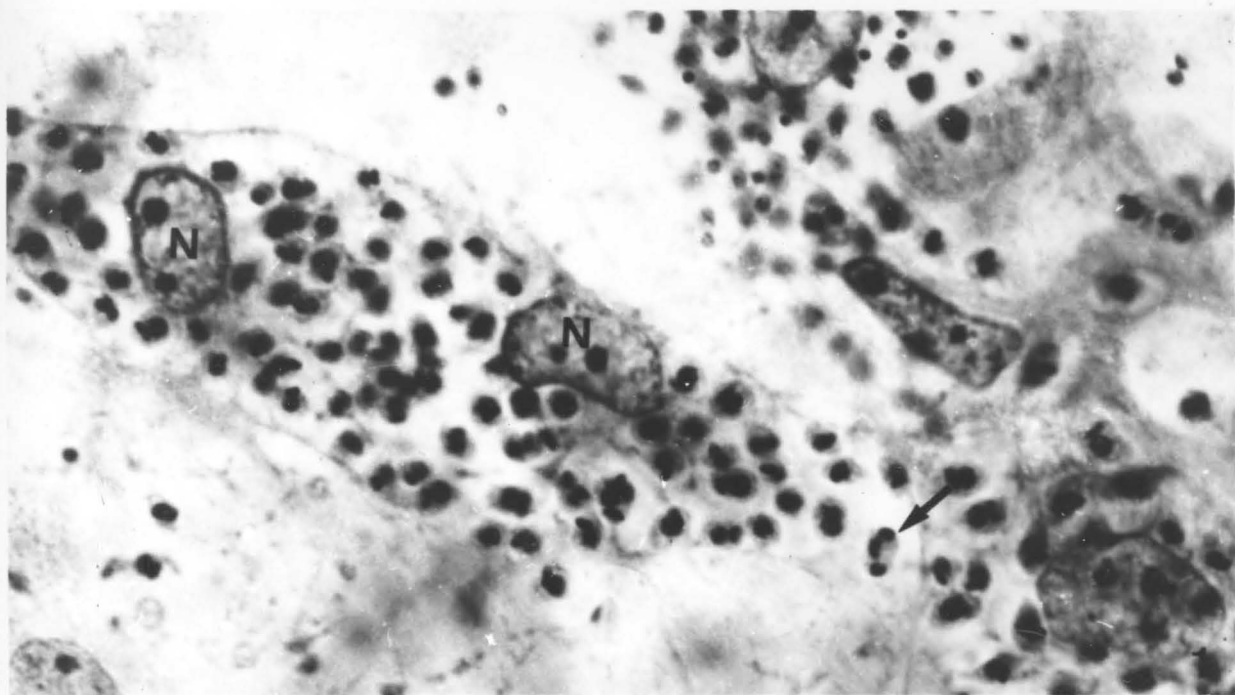
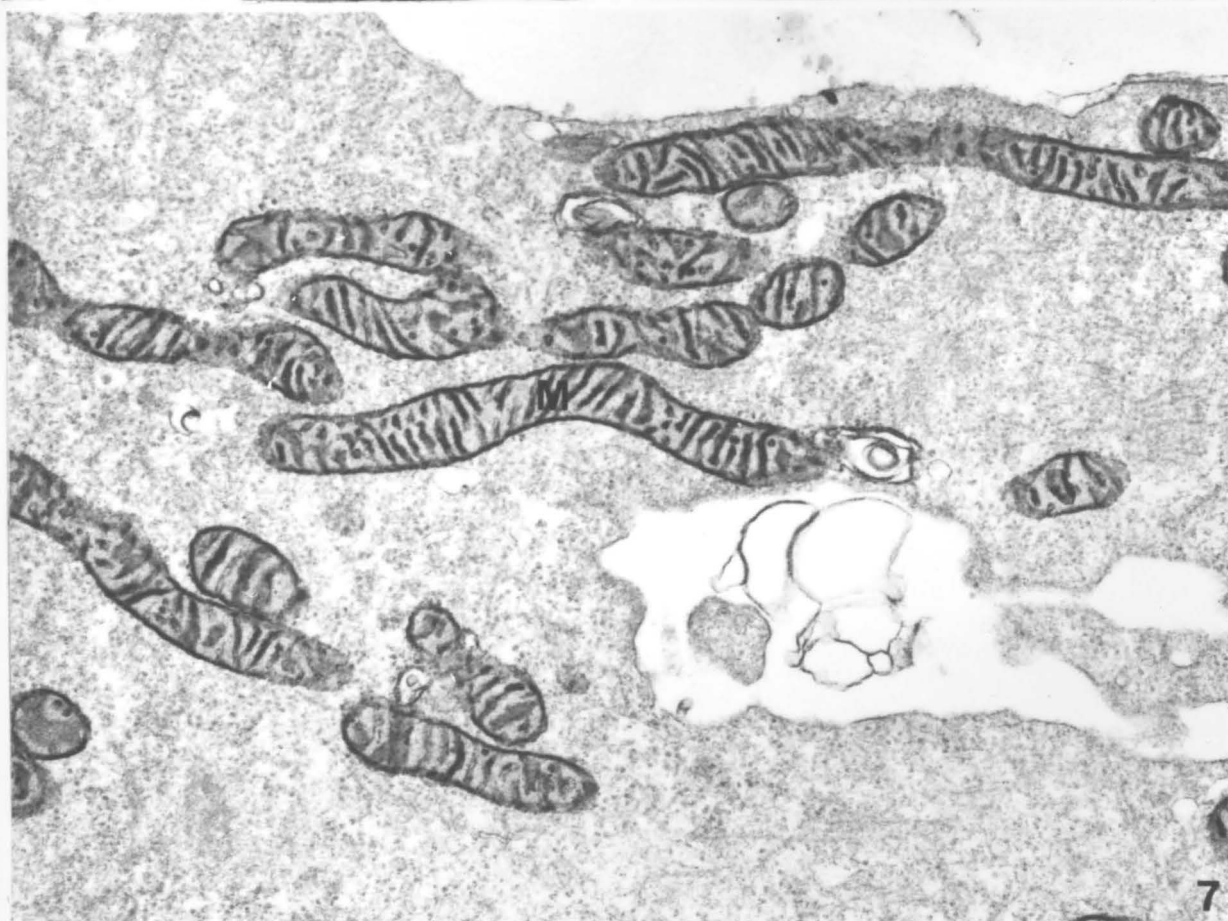
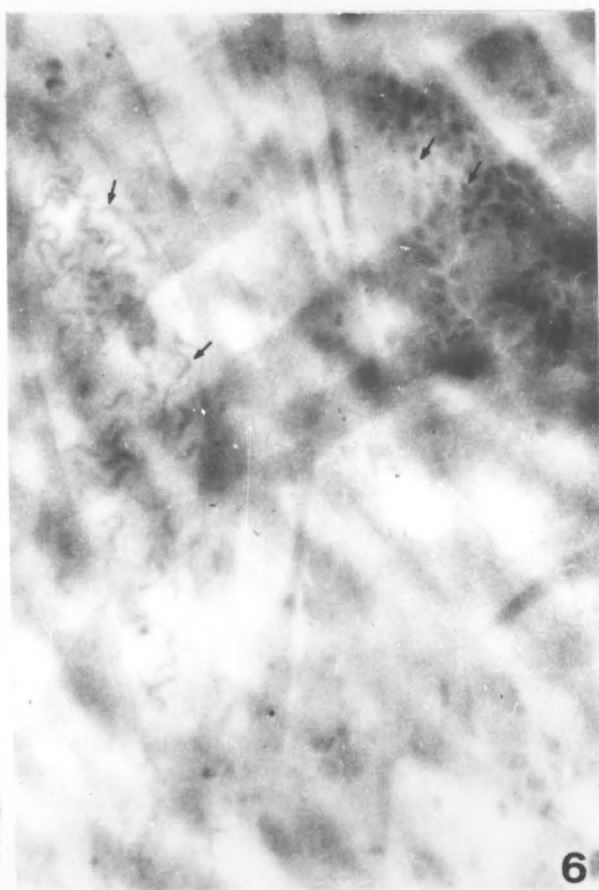


Fig. 5 - Células de miocárdio revelando a atividade da enzima Citocromo Oxidase. No campo, células sem parasitos com núcleo (N) e mitocôndrias no citoplasma na forma de grãos marrons. A seta indica uma célula parasitada, com as mitocôndrias em volta do parasito. X 1200

Fig. 6 - A reação para revelação da Citocromo Oxidase foi inibida pelo Cianeto de Potássio. As setas indicam células cheias de parasitos. As mitocôndrias não são evidenciadas neste controle. X 1200

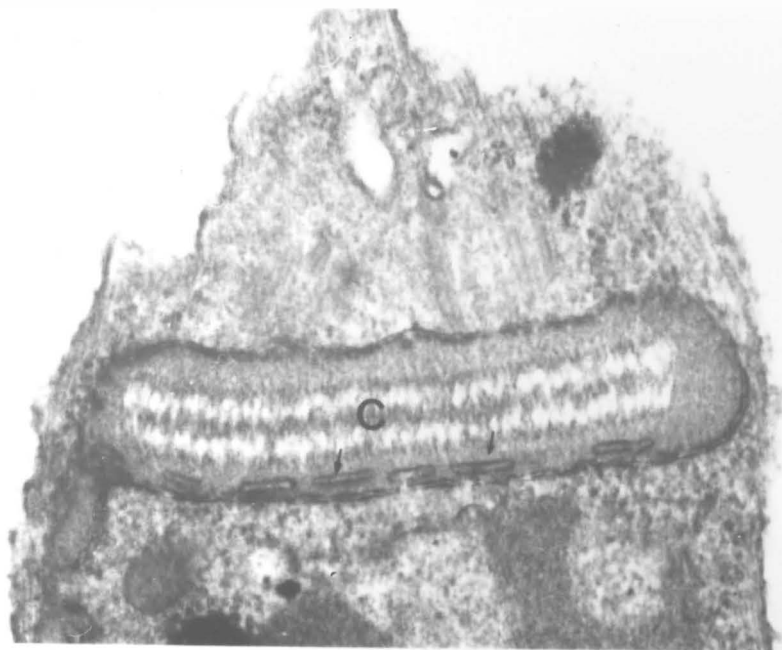
Fig 7 - Ultra-estrutura de uma célula de miocárdio apresentando forte reação na mitocôndria na membrana interna e nas cristas mitocondriais (M). X30000



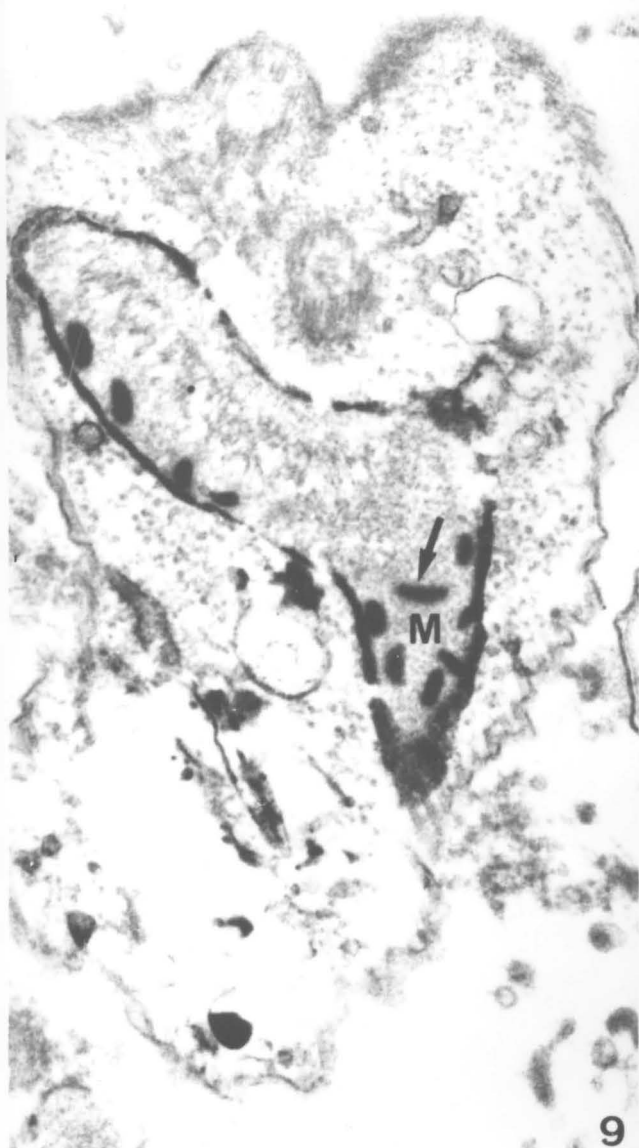
Citocromo Oxidase

Fig. 8 - Parasito liberado da célula mostrando o cinetoplasto (C) e forte reação na membrana interna e nas cristas mitocondriais. X 60000

Fig. 9 e 10 - Parasitos intracelulares mostrando o sítio de a tividade da Citocromo Oxidase numa reação forte na mitocôndria na membrana interna e nas cristas mitocondriais (↓). fig. 9 X 45000; fig. 10 X 30000



8



9



10

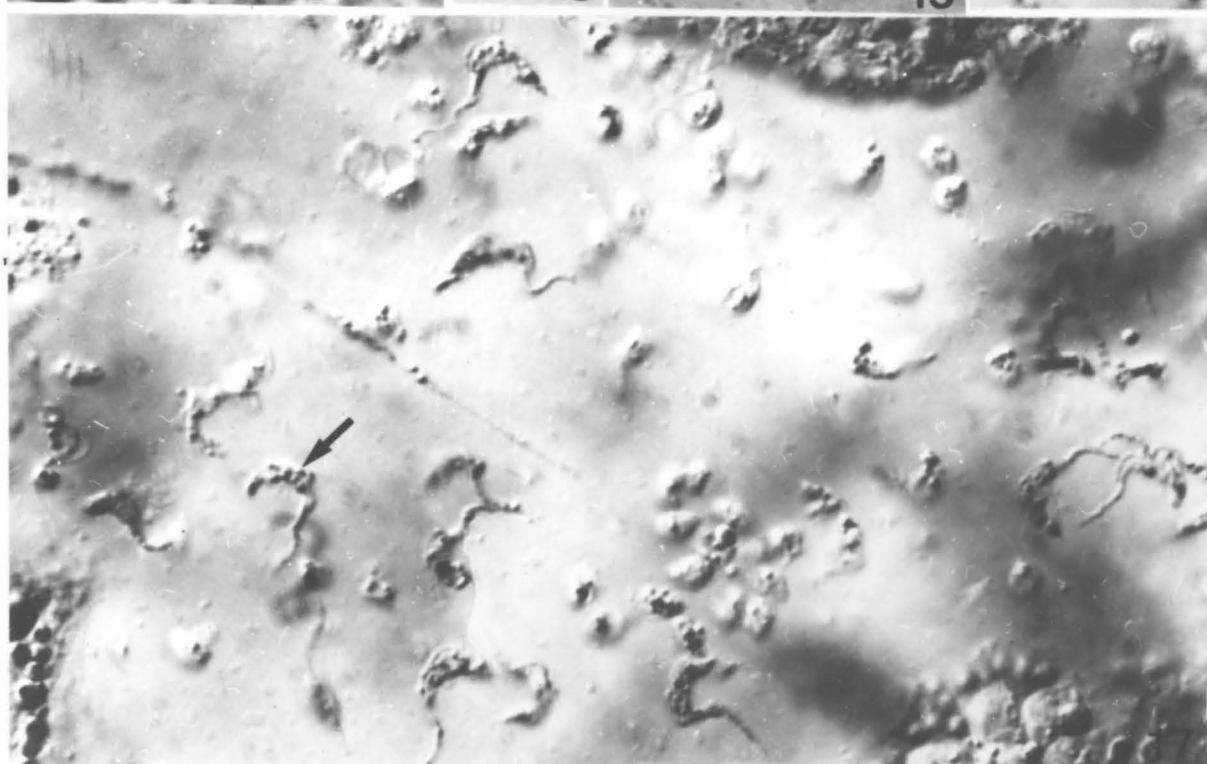
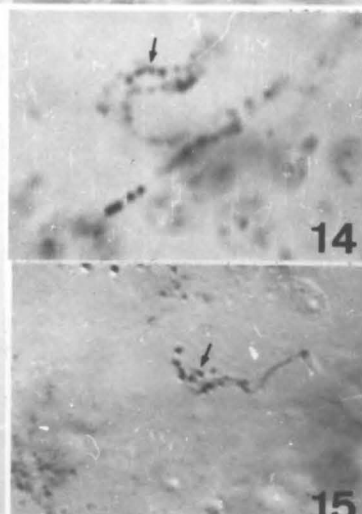
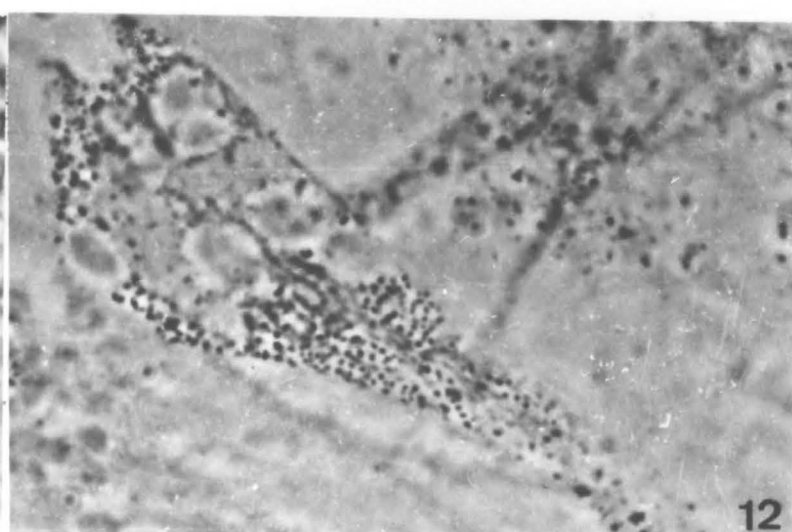
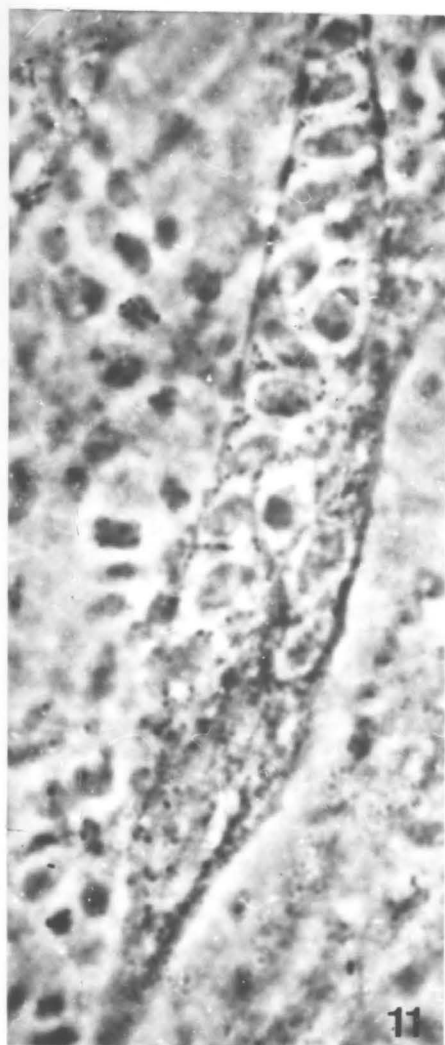
Fig. 11 e 12 - Células de miocárdio parasitadas pelo Trypanosoma cruzi revelam a presença da Succinato Desidrogenase nas mitocôndrias visíveis na forma de grãos azuis em volta dos parasitos (↓) e ocupando todo o citoplasma útil da célula parasitada. fig. 11 X 1500; fig. 12 X 1500

Fig. 13 - Forma de transição do parasito mostrando reação da Succinato Desidrogenase na forma de 5 a 7 grãos azuis. X 1500

Figs. 14 e 16 - Parasitos livres no meio mostrando a presença da Succinato Desidrogenase na forma de 8 a 15 grãos de cor azul (↓) fig. 14 X 1500; fig. 16 X 1500

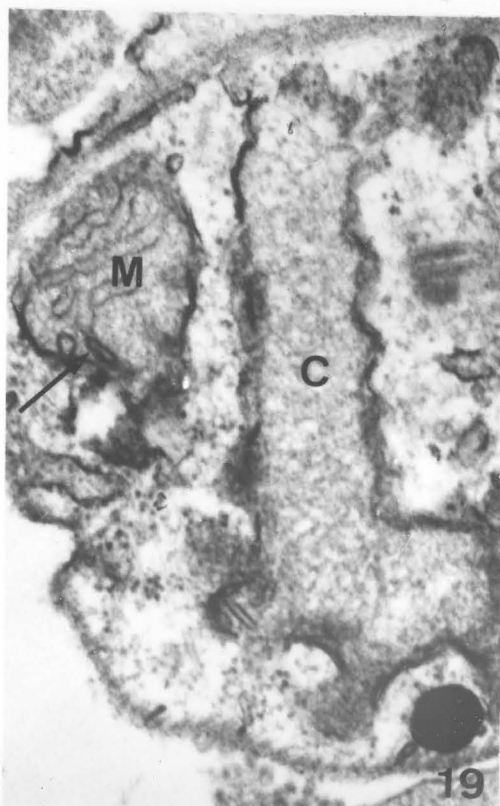
Fig. 15 - Trypanosoma cruzi livres no meio. A seta indica a presença da reação da Succinato Desidrogenase na forma de grãos azuis (8 a 15) numa melhor visualização com o contraste Nomarski de Amplitude. X 1500

Fig. 17 - Formas esferomastigotas e tripomastigotas mostram a presença da Succinato Desidrogenase. A seta indica um dos parasitas livres com a reação em que os grãos azuis aparecem em relevo. Contraste Nomarski de Amplitude. X 1500



Figs. 18 e 19 - Ultra-estrutura de parasitos intracelulares mostram a reação da Succinato Desidrogenase na mitocôndria na membrana interna e nas cristas mitocondriais. Cinetoplasto (C), mitocôndria (M) fig. 18 X 45000 ; fig. 19 X 60000

Fig. 20 - Corte de célula de miocárdio parasitada vendo-se a reação da Succinato Desidrogenase na mitocôndria (M) nas cristas e membrana interna mitocondriais. Núcleo (N) X 45000



Isocitrato Desidrogenase

Fig. 21 - Contraste de Fase. Célula cheia de parasitos que revelam o sítio de atividade da Isocitrato Desidrogenase numa reação muito forte na forma de grãos azuis. A seta indica uma célula onde pode se seguir o trajeto da mitocôndria na forma intracelular esferomastigota.

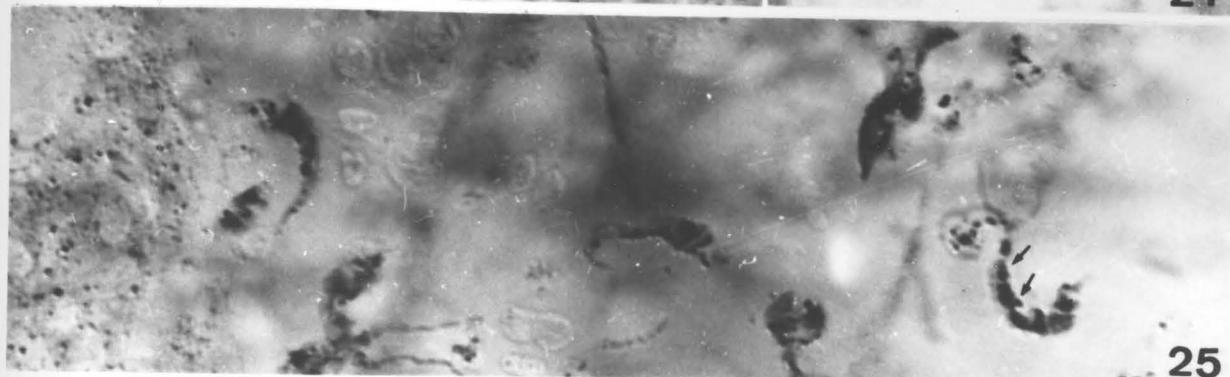
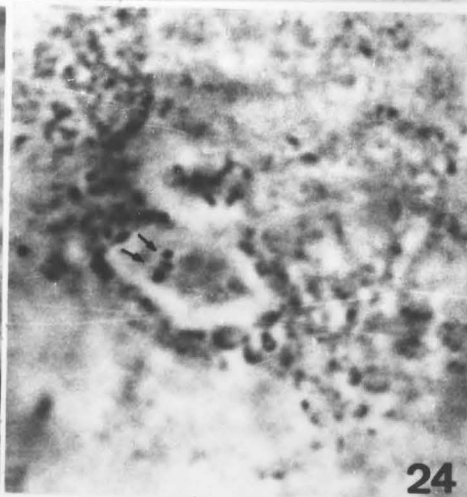
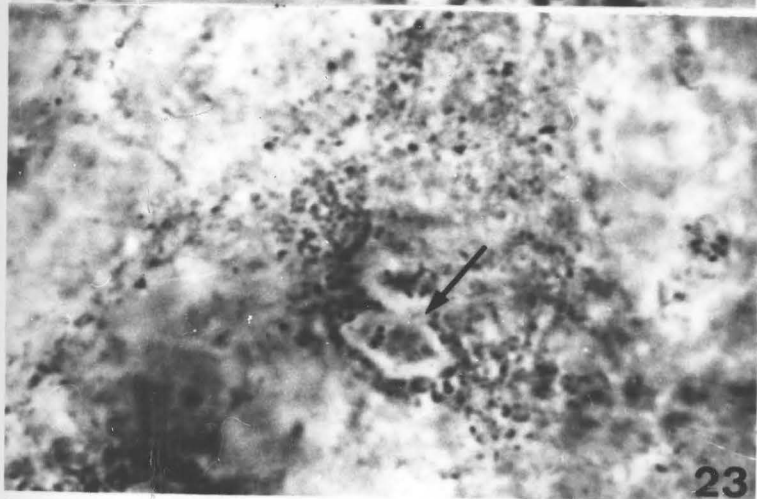
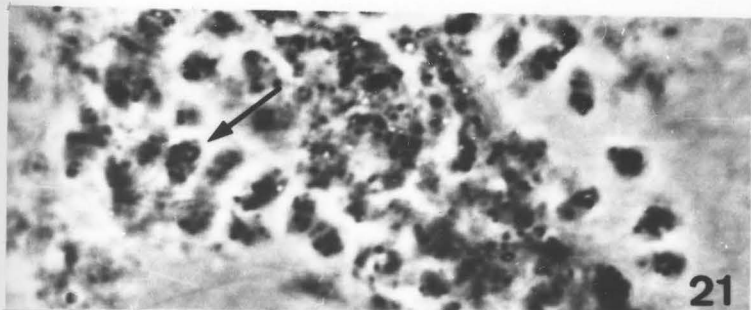
X 1500

Fig. 22 - O mesmo parasito aumentado, em campo claro, mostra o trajeto da mitocôndria no corpo celular numa reação visível na forma de 7 a 8 grãos. X 2200

Figs. 23 e 24 - Célula parasitada de miocárdio mostrando a atividade da enzima no citoplasma celular e na forma esferomastigota do parasito assinalada na seta (fig.23). A mesma célula é vista em aumento maior (fig. 24). Fig. 23 X 1500; fig. 24 X 2200

Fig. 25 - Parasitos livres no meio revelam a atividade da enzima na forma de 8 a 15 grãos azuis (↓). Contraste Nomarski de Amplitude X 1800

Fig. 26 - Uma célula muito parasitada onde se vê o núcleo (N) e o citoplasma cheio de formas esferomastigotas e forte reação nas mitocôndrias que ocupam o citoplasma livre da célula. Contraste Nomarski de Amplitude. X 1800



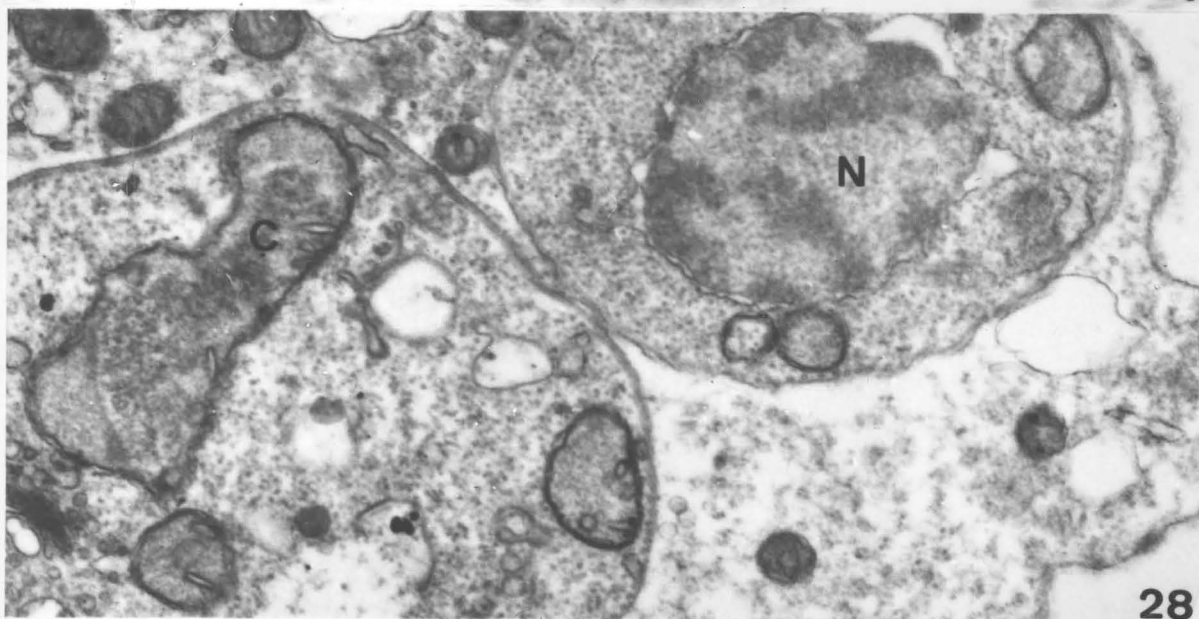
Isocitrato Desidrogenase

Fig. 27 - Parasito intracelular mostrando forte reação na mitocôndria (M) na região das cristas e membrana interna (↓). X 4500

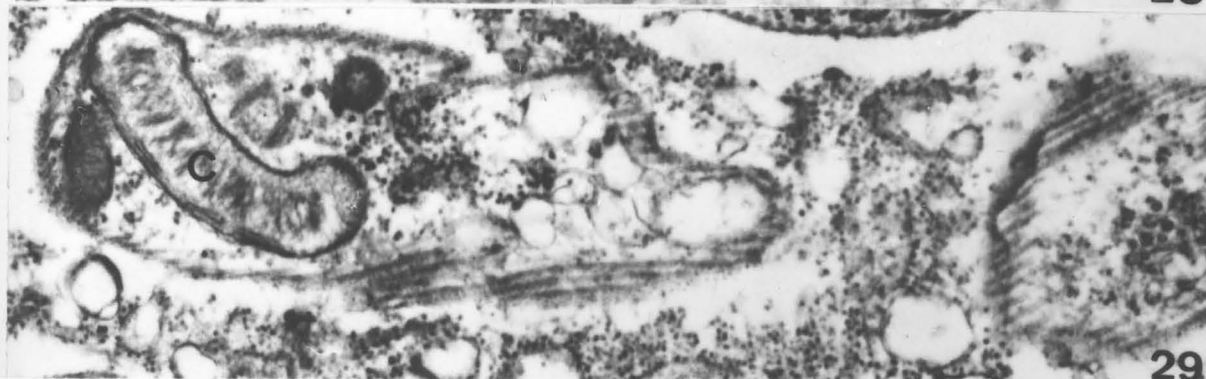
Figs. 28 e 29 - Parasitos intracelulares são vistos com reação nas cristas e membrana interna mitocondriais. Núcleo (N) e Cinetoplasto (C). Fig. 28 X 30000; fig. 29 X 30000



27



28



29

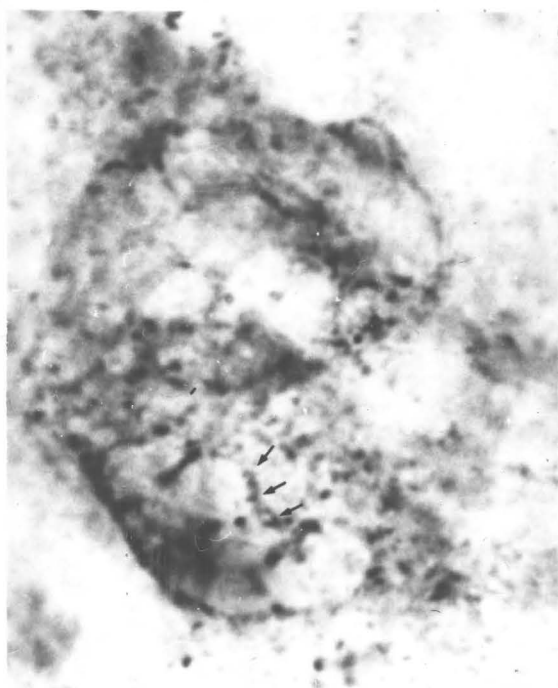
α Glicerofosfato Desidrogenase

Fig. 30 - Fotografia em campo claro mostrando o sítio de atividade da enzima. As setas indicam o local das mitocôndrias que são vistas como grãos azuis em volta dos parasitos. X 1500

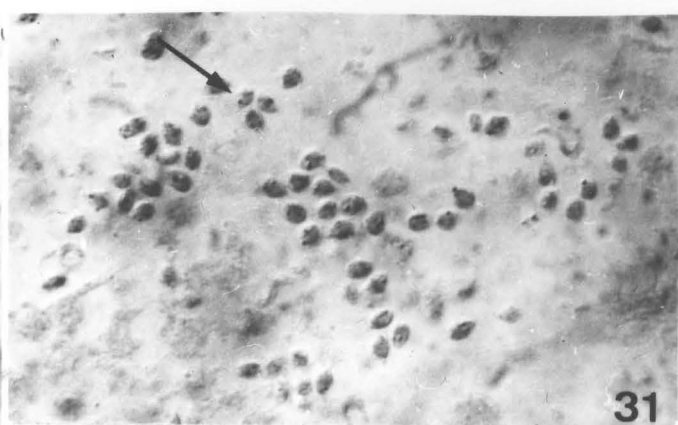
Figs. 31 e 32 - A reação é vista em volta dos parasitos, no citoplasma disponível da célula (fig. 32) ou na forma de 5 a 7 grãos azuis nas esferomastigotas (\downarrow). Fig. 31 X 1800; fig. 32 X 1000

Fig. 33 - Localização da α Glicerofosfato Desidrogenase numa reação de membrana interna mitocondrial (\downarrow). Vê-se a continuidade do cinetoplasto (C) com a mitocôndria (M). X 45000

Fig. 34 - Célula de miocárdio com parasitos mostrando num deles a reação moderada da enzima na membrana interna da mitocôndria (M). Cinetoplasto (C), Núcleo (N). As setas assinalam as mitocôndrias da célula hospedeira que ocupam os espaços entre os parasitos. X 30000.



30



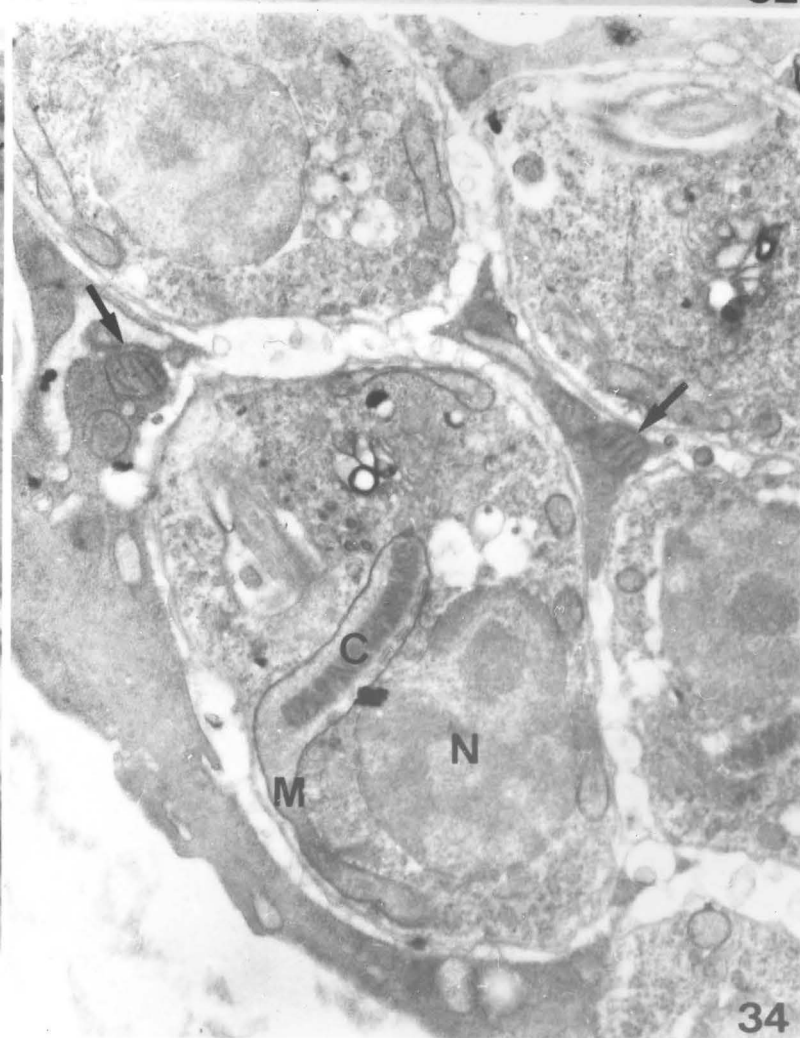
31



32



33



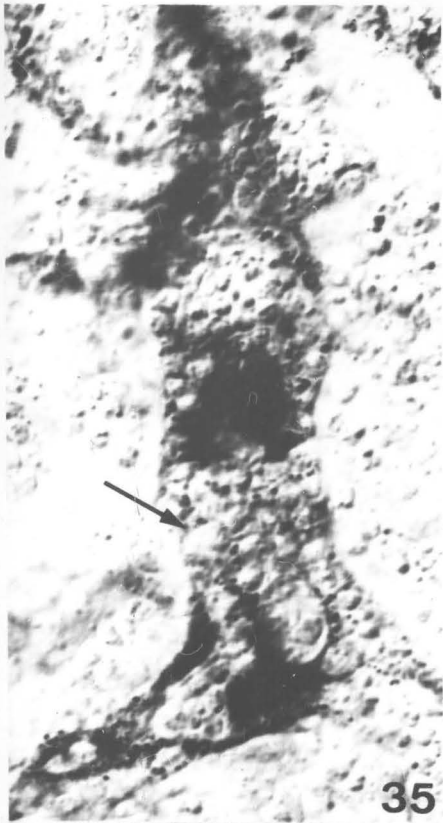
34

β Hidroxibutirato Desidrogenase

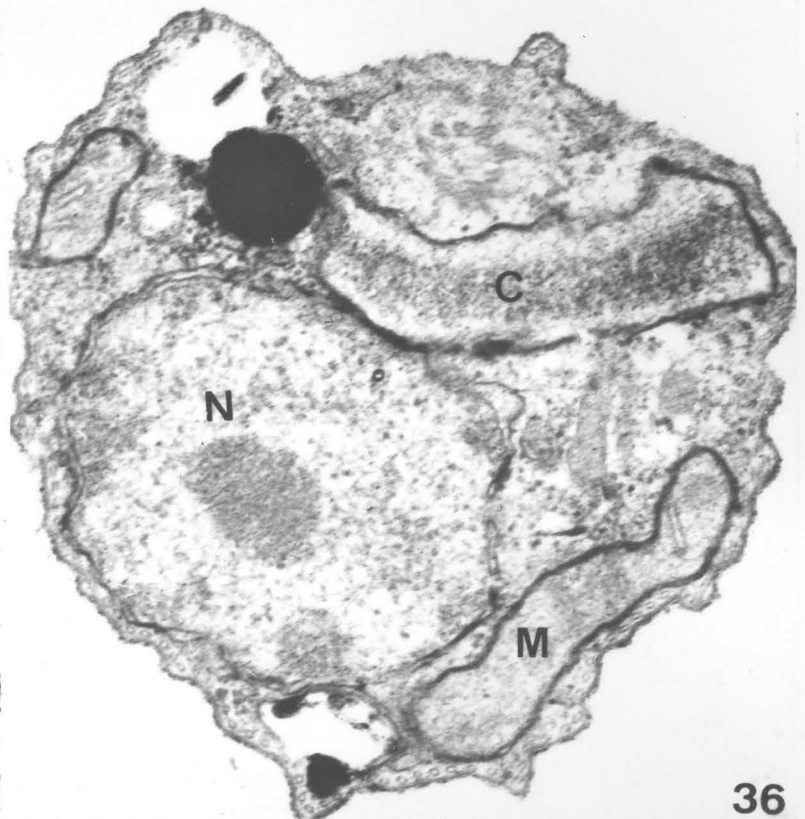
Fig. 35 - Campo com células parasitadas onde a reação é vista em volta dos parasitos intracelulares e no espaço citoplasmático livre da célula hospedeira. Contraste Nomarski de Amplitude. X 1800

Fig. 36 - Ultra-estrutura de um parasito liberado no meio com forte reação na membrana interna da mitocôndria (M). Núcleo (N) e Cinetoplasto (C) X 45000

Fig. 37 - Parasito liberado no meio mostrando uma reação de membrana interna em várias regiões da mitocôndria do corpo celular (\downarrow). Cinetoplasto (C) Núcleo (N) X 30000



35



36



37

NADPH tetrazolio redutase

Fig. 38 - Campo mostrando parasitos intracelulares com reação mitocondrial na forma de grãos azuis (↓) X 1500

Fig. 39 - A mesma célula em aumento maior revelando a presença da NADPH tetrazolio redutase na forma de 6 grãos a zuis (↓) X 2200

Fig. 40 - Parasitos livres no meio revelam a presença da enzima na forma de 8 a 15 grãos azuis (↓) X 1800

Figs. 41 e 42 - Parasitos intracelulares com forte reação de cristas (↓) e membrana interna mitocondriais. Vê-se a continuidade do Cinetoplasto (C) com a mitocôndria (M). Flagelo (F) fig. 41 X 4500; fig. 42 X 45000

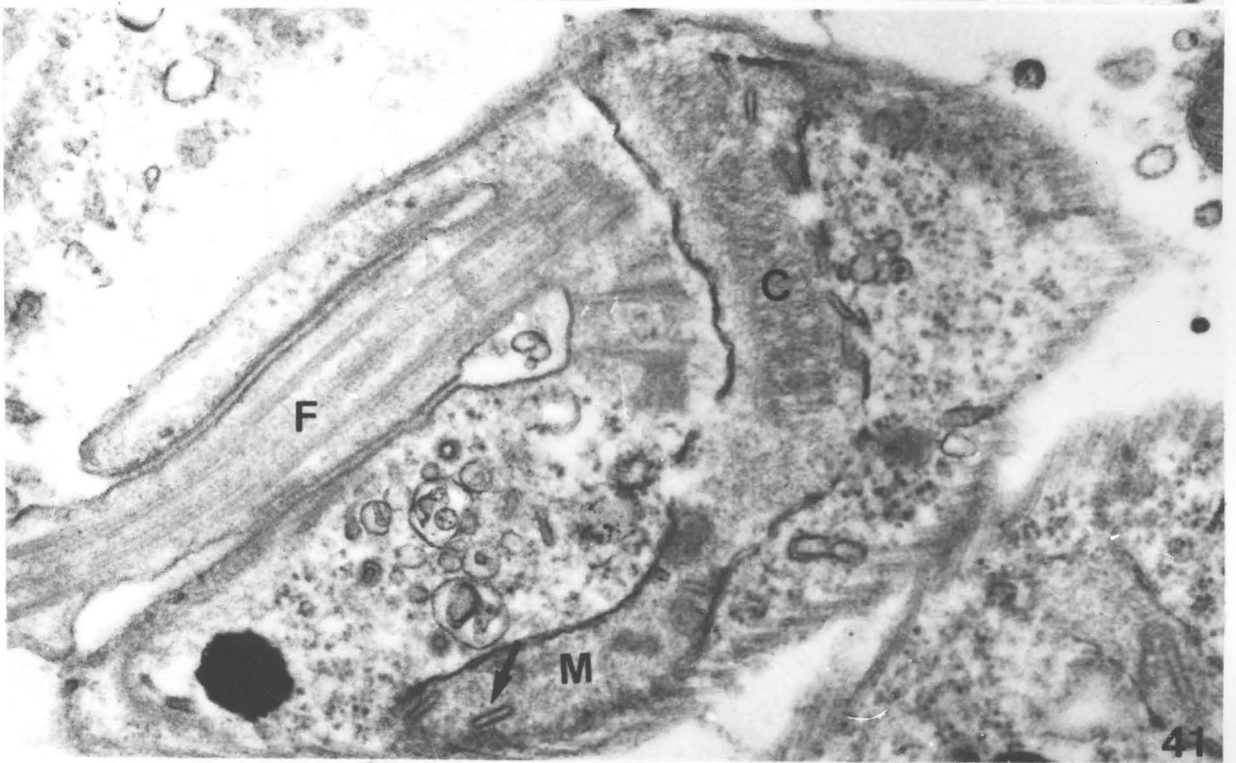
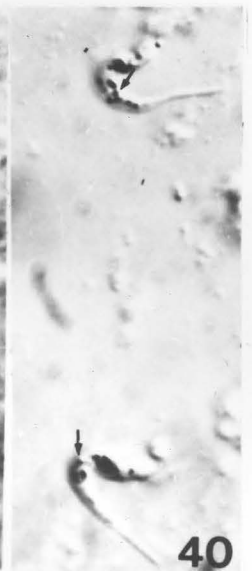
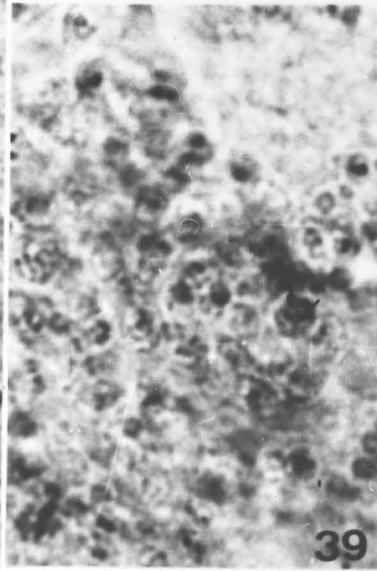
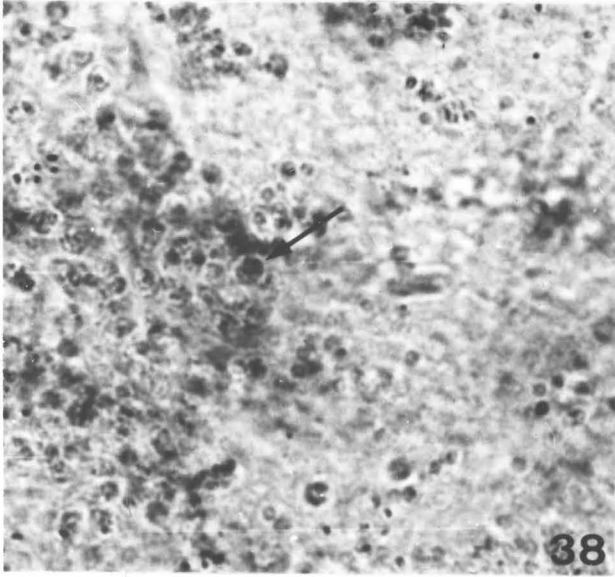
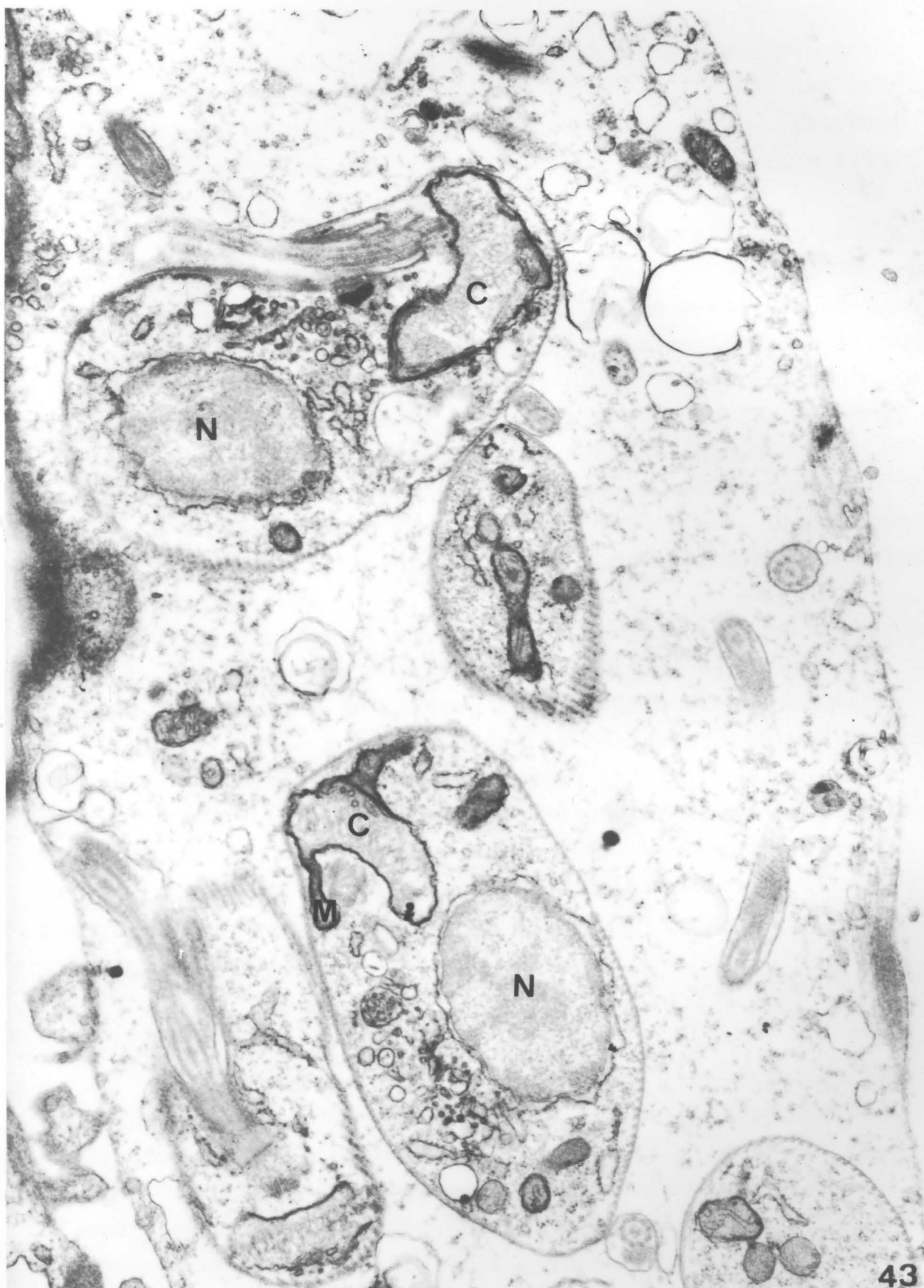


Fig. 43 - Célula de miocárdio cheia de parasitos mostram numa reação forte a enzima NADPH tetrazolio redutase na membrana interna e cristas mitocondriais (M). Cinetoplasto (C); Núcleo (N) fig. X 22500



DISCUSSÃO

O Trypanosoma cruzi tem um ativo sistema citocromo durante o seu inteiro ciclo de vida (Hill, 1970). Há uma associação funcional do transporte de eletrons ao sistema citocromo mitocondrial e às reações enzimáticas do ciclo do ácido tricarboxílico (Do Campo et al., 1978).

Com a finalidade de obter dados para a compreensão do sistema de transporte de eletrons nas formas epimastigotas do Trypanosoma cruzi e posterior comparação com o sistema de transporte de eletrons das outras formas (esferomastigotas e tripomastigotas) Figueiredo (1973) estudou o efeito de vários inibidores respiratórios na presença de glicose e succinato. Na presença de glicose a respiração foi inibida por KCN, azida sódica, Antimicina A e Rotenona. Em presença de succinato só Rotenona não mostrou efeito respiratório indicando que a Succinato Desidrogenase está ligada a uma flavoproteína da mesma forma que em outros sistemas biológicos.

Gutteridge et al. (1978) mostraram em estudos bioquímicos preliminares que formas intracelulares, de sangue e de cultura acelular tem um sistema respiratório que é, em parte, sensível ao cianeto e que em todas as formas sintetizam ácidos nucleicos e proteínas quando incubados in vitro. O consumo de O_2 das formas intracelulares e de sangue mostraram-se semelhantes às formas de cultura acelular o que sugere que diferenças na respiração entre as diferentes formas não são tão extremas quanto às dos Tripanosomas do subgrupo Trypanosoma brucei descritas por Vickerman, 1962.

Citocromo Oxidase (E.C. 1.9.3.1)

A atividade de citocromo oxidase tem sido demonstrada em cortes de tecidos tanto a nível ôtico (Seligman et al., 1958) como ultra-estrutural (Seligman et al., 1964) com $NaDi$ reagentes (λ naphthol dimethyl-p-phenylenediamina) em músculo cardíaco, sendo sempre encontrado na mitocôndria. Com a introdução recente de análogos de bis-orthophenylenediamina, 3'3 diaminobenzidina (DAB), ocorreu um significativo avanço na citoquímica (Seligman et al., 1975). Os achados citoquímicos corroboraram

com a extensiva evidência bioquímica que as enzimas da cadeia respiratória residem nas cristas bem como na membrana interna da mitocôndria (Lehninger, 1964, Seligman et al., 1968). Citocromo Oxidase é um polímero complexo formado de várias sub-unidades que incluem Citocromo c, a, e a_3 e dois elementos de cobre.

A reação mitocondrial que é confinada à membrana interna e crista mitocondrial e é inibida pelo cianeto de potássio (KCN) e azida sólida é atribuída a reação do citocromo a, a_3 e O_2 com o citocromo c que é o recipiente dos eletrons reagentes (Seligman et al., 1975). O produto da reação "osmium black" revela o segmento terminal ou triplete da cadeia respiratória transportadora de eletrons.

O Trypanosoma cruzi pertence ao grupo dos tripanosomas que contém o Sistema Citocromo sendo que os dados bioquímicos existentes se referem a formas epimastigotas de cultura e formas sangüícolas (Von Brand & Johnson, 1946, Fulton & Spooner, 1959). É justificável supor que todos os tripanosomatídeos de insetos e formas de intestino cianeto sensíveis tem um sistema citocromo localizado na mitocôndria sendo que este sistema também está presente em formas de sangue do T. cruzi e do T. lewisi e espécies de Leishmania (Hill, 1970).

Cosgrove (1966) localizou citoquimicamente citocromo oxidase no cinetoplasto de várias espécies de Crithidia incluindo Crithidia fasciculata e outros tripanosomatídeos de insetos como Leptomonas collosoma e Blastocrithidia culicis a nível de microscopia ótica. A nível ultra-estrutural, o mesmo autor localizou citocromo oxidase em Crithidia fasciculata com a técnica da diaminobenzidina (Seligman et al., 1968). Também com a técnica da diaminobenzidina, Barber & Ward (1972) localizaram esta enzima no Trypanosoma brucei e De Souza et al. (1977) detectaram citocromo oxidase em Herpetomonas samuelpessoai.

No Trypanosoma cruzi a presença da Citocromo Oxidase a nível de microscopia ótica foi primeiro revelada por Kallinikova (1968) em todos os estágios do ciclo de vida: amastigota, epimastigota, formas metacíclicas de cultura bem como Tripomastigotas e amastigotas de camundongos infectados. O autor utilizou a reação de Moog baseada na deposição de grãos a

zuis de indophenol nos locais de atividade da enzima, mostrando uma alta atividade em todos os estágios de vida deste kinetoplasma tida.

Recentemente, Warton (1977) no Congresso de Protozoologia em Nova York comunicou em breve nota ter localizado citocimicamente a nível de microscopia ótica e eletrônica a atividade da Citocromo Oxidase em T. cruzi. A nível ótico usou 1-naphtol e dimethylparaphenyldiamine e a nível ultra-estrutural revelou a atividade enzimática pelo método de DAB.

No nosso trabalho localizamos a citocromo oxidase tanto a nível ótico (Seligman et al., 1968) como a nível ultra-estrutural (Anderson et al., 1975) pela técnica da diaminobenzidina, numa reação que se revelou muito intensa tanto nas mitocôndrias da célula hospedeira como nos parasitas intracelulares ou livres no meio.

Succinato Desidrogenase (E.C. 1.3.99.1)

Segundo Baernstein (1955) o succinato é, sem dúvida, um dos principais produtos finais do T. cruzi em cultura acelular. A succinato desidrogenase é uma flavoproteína ligada à mitocôndria, descrita por Thumberg (1909) e que catalisa a reação:



Seligman e colaboradores (1971) localizaram esta enzima nas cristas mitocondriais e no compartimento externo de células musculares cardíacas e esqueléticas. Resultados semelhantes foram observados na mitocôndria das células pilosas da cóclea (Spector, 1975).

A presença da succinato desidrogenase em T. cruzi foi assinalada por Seaman (1953) e Agosin & Von Brand (1955) em homogenizados e frações celulares utilizados nos estudos bioquímicos. Estes últimos autores mediram a atividade da enzima bem como sua inibição pelo malonato.

Segundo Spector (1975) a succinato desidrogenase é uma enzima facilmente inibida num tempo mínimo de 3 minutos ou mais de fixação em glutaraldeído e paraformaldeído. Andersen & Hoyer (1973) propõem como recurso de preservação da atividade

nativa da enzima, uma fixação de apenas 5 minutos com glutaraldeído e paraformolaldeído.

O dimethyl sulfoxido (DMSO) utilizado no meio de incubação facilita a penetração do succinato e das duplas cargas positivas de sal Dystyryl NitroBlue Tetrazolium (DSNBT) (Spector, 1975) através das membranas celulares preservando as estruturas. Para Andersen e Hoyer (1973) o DMSO tem o possível efeito de facilitar o transporte de eletrons do grupo Tiol das desidrogenases para os aceptores de Tetrazolio.

Pearse (1972) refere que, na prática, a investigação desta enzima é comumente realizada pela técnica padrão da redução de sais de tetrazolio mas a acurada interpretação do nível da atividade da enzima não pode ser feita sem o conhecimento do nível de CoQ na mitocôndria das células estudadas desde que esta coenzima supostamente conecta parte da flavoproteína do complexo succinoxidase com o sistema citocromo e age similarmente como transportadora entre a flavoproteína desidrogenase e o sal de tetrazolio no método histoquímico.

Cosgrove (1966) localizou com sais de tetrazolio a succinato desidrogenase em Crithidia fasciculata.

Chacravarty et al. (1962) demonstraram histoquimicamente a presença desta enzima em culturas acelulares e em tripomastigotas sangüícolas de T. cruzi, com o sal NBT em presença de brilhante cresyl, na forma de grãos azul escuro localizados no citoplasma e no interior do flagelo nas formas de cultura e, sõ no citoplasma, nas formas sangüícolas. A presença de grandes grãos azuis no citoplasma, é para os autores, consistente com a sua localização mitocondrial.

Lehmann & Claflin (1965) localizaram esta enzima numa cepa de T. cruzi mantida em meio acelular utilizando a técnica de Barka e Anderson, que usaram sais de tetrazolio. A reação, sem localização particular, apresentou-se como grãos situados por todo o citoplasma do flagelado.

Neste trabalho testamos para localização ultra-estrutural, 4 métodos de fixação, descritos em Material e Métodos, sendo os melhores resultados obtidos fixando-se com 1% de glutaraldeído e 1% paraformolaldeído em tampão fosfato 0.1M pH 7.4 a acredido de 7% de sacarose durante 10 minutos a temperatura am

biente.

Como aceptores de hidrogênios da reação utilizamos o sal de tetrazolio NBT para nível ótico e DSNBT para nível ultra-estrutural. A reação se revelou moderada localizando-se tanto nas células como nos parasitos.

Isocitrato Desidrogenase (E.C. 1.1.1.42)

Duas desidrogenases isocítricas ligadas a coenzima I (NAD) e a coenzima II (NADP) catalisam reações de descarboxilação



A importância da isocitrato desidrogenase vem de seu papel no ciclo de Krebs.

Em 1956, Agosin & Weinbach trabalhando com homogenizados e frações celulares do Trypanosoma cruzi conseguiram uma purificação de 50 vezes, de uma desidrogenase isocítrica NAD ligada que era inibida fortemente por p-clorêmercuribenzoato e menos marcadamente pelo sulfato de cobre. As evidências da presença da enzima, para os autores, foi a obtenção do ácido 2 oxoglutarico como produto de reação e a redução do NAD na presença do DL ácido isocítrico.

Estudos bioquímicos de Hill & White (1968) localizaram isocitrato desidrogenase entre as proteínas mitocondriais de Crithidia fasciculata. Marr & Weber (1969) estudaram a inibição desta enzima pela ação de nucleosídeos trifosfatados em Crithidia fasciculata.

Tentativas de localização desta enzima foram feitas por Lehman & Claflin (1965) em formas de cultura acelular do Trypanosoma cruzi, fixadas ou não, com tempos de incubação de 1 hora utilizando sais de tetrazolio, sem que, no entanto, fossem bem sucedidas.

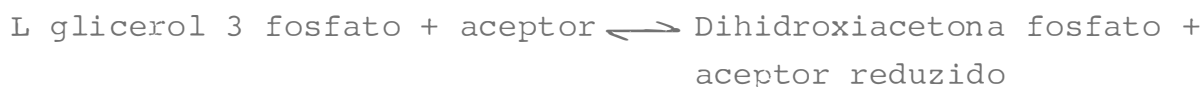
Cosgrove (1966) localizou citoquimicamente isocitrato desidrogenase no condrioma de Crithidia fasciculata a nível de microscopia ótica usando sais de tetrazolio.

A demonstração desta enzima no Trypanosoma cruzi prevê evidência adicional da realização do ciclo de ácido tricarboxílico neste parasito.

Os resultados da nossa investigação foram possíveis com a enzima NADP ligada. A isocitrato desidrogenase pode ser revelada tanto pela coenzima I como pela coenzima II. Os melhores resultados histoquímicos por nós obtidos foram com a coenzima II (NADPH). A atividade da enzima é muito intensa tanto nas células hospedeiras como nos parasitos.

• Glicerofosfato Desidrogenase (E.C. 1.1.2.1)

Existem duas enzimas GDP nos tecidos animais, uma NAD ligada e outra mitocondrial entrando na cadeia respiratória pelo FAD. A flavoproteína ligada à mitocôndria oxida a reação:



Esta enzima foi primeiro estuda por Green em 1936, que mostrou ser esta enzima uma desidrogenase citocromo redutora. Estudos posteriores de Ringler & Singer (1959) em mitocôndrias de cérebro de porco, mostraram que existe uma competição entre a succinato desidrogenase e a glicerofosfato desidrogenase na cadeia respiratória que pode ser demonstrada tendo como acceptor terminal de eletrons o O_2 ou citocromo c, sendo as duas enzimas estruturalmente e funcionalmente interligadas. Antes, em 1955, Wu & Tsou já haviam concluído que uma cadeia respiratória comum servia às duas enzimas.

A demonstração histoquímica da GDP mitocondrial foi possível com a descoberta de Wattemberg e Leong (1960) que Mena dione (vitamina K3) podia efetivamente transferir eletrons da enzima flavoproteína reduzida para o sal de tetrazolio. Para Lehninger (1970) a GDP mitocondrial é uma enzima fortemente ligada à membrana interna da mitocôndria.

Não encontramos evidências bioquímicas e citoquímicas da presença desta enzima no Trypanosoma cruzi. Nossos estudos fornecem dados da presença da flavoproteína na mitocôndria tanto nas células de miocárdio de embrião de pinto como no Trypanosoma cruzi que as parasita.

• Hidroxibutirato Desidrogenase (E.C. 1.1.30)

Esta enzima faz parte do metabolismo dos lipídios e

entra na cadeia transportadora de eletrons pelo NAD catalisando a reação:



Em 1960, Lehninger demonstrou que a enzima β HBD NAD ligada era localizada na mitocôndria de tecidos animais. Em trabalho posterior, em 1962, Wise e Lehninger, na mitocôndria de fígado de rato, tiveram evidências da específica relação entre β HBD e a cadeia respiratória sendo sua estabilidade relacionada com a interação da cadeia e o Succinato, NAD e ATP.

Não encontramos referências de investigação bioquímica ou cittoquímica desta enzima no Trypanosoma cruzi. Nesses estudos revelam a presença desta enzima tanto nas células embrionárias de coração de pinto como nos parasitos.

NADPH Tetrazolio Redutase (NADPH diaforase)

As coenzimas específicas agem como transportadoras na passagem de eletrons e hidrogênios do substrato original para o oxigênio molecular.

A localização histoquímica das NADH e NADPH diaforases foi realizada primeiro por Farber et al. (1956). Para a Coenzima I (NAD) usaram uma desidrogenase exógena junto com o substrato e oxidaram NAD com o fim de gerar NADH como substrato para a diaforase intrínseca dos tecidos. Para a Coenzima II (NADP) conseguiram demonstrá-la sem o auxílio da desidrogenase exógena fornecendo contudo um substrato para a desidrogenase endógena. Em 1958, Nachlas, Walker & Seligman em cortes de rim e estômago de rato apresentaram seus resultados obtidos com um novo sal NitroBluetetrazolio (NBT) na demonstração da NADH diaforase. Embora obtivessem uma melhor localização da diaforase este método não demonstrou todos os sítios de atividade da enzima a menos que uma desidrogenase exógena fosse acrescentada. Scarpelli, Hess & Pearse (1958) localizaram citoquimicamente com sais de tetrazolio tanto a NADH como a NADPH nas mitocôndrias de glândulas salivares, estômago e fígado de rato. Os autores acharam que a ótima redução dos sais de tetrazolio ocorre quando a coenzima tem a mesma concentração do substrato (0.1M) embora bons resultados sejam obtidos usando 1/10 dessa quantidade (0.01M). A coenzima reduzida pode ser considerada substrato para a diaforase:



Em alguns tripanosomatídeos a morfologia mitocondrial foi demonstrada com a NADH tetrazolio redutase. Massey (1960) em formas epimastigotas de cultura do Trypanosoma mega e Vickerman (1965, 1969) em formas tripomastigotas sangüícolas de Trypanosoma brucei e Trypanosoma congolense demonstraram o mesmo sítio de atividade desta enzima.

Em 1968, Kallinikova demonstrou a presença de NADH e NADPH em todos os estágios de vida do Trypanosoma cruzi por meio de sais de tetrazolio. Tanto nas formas de cultura acelular como nos tripomastigotas e esferomastigotas de órgãos de camundongos infectados o produto de reação aparecia na forma de grãos irregulares sobretudo para a NADPH tetrazolio redutase.

No nosso estudo, a reação citoquímica se revelou muito intensa tanto nas células hospedeiras como nos parasitos intracelulares e livres no meio, numa localização a nível ótico e ultra-estrutural.

CONCLUSÃO

Nossos achados citoquímicos confirmam os resultados das investigações de Lehninger (1970) que demonstraram que as enzimas do ciclo de Krebs se encontram na membrana interna e na matriz mitocondriais e nos permitem concluir:

1. Mostraram localização semelhante, embora com variações na intensidade da reação, as seguintes enzimas: Citocromo Oxidase, Succinato e Isocitrato Desidrogenase e NADPH tetrazolio Redutase. A reação citoquímica foi evidenciada na membrana interna e cristas mitocondriais do Trypanosoma cruzi intracelular e do liberado no meio e também nas mitocôndrias das células hospedeiras. Com a Succinato Desidrogenase foi visto uma reação moderada enquanto que com Isocitrato Desidrogenase, NADPH tetrazolio Redutase e Citocromo Oxidase observou-se uma reação muito forte.

2. As enzimas da via dos lipídios α Glicerofosfato e β Hidroxibutirato Desidrogenases, que entram na cadeia transportadora de eletrons a primeira pelo FAD e a segunda pelo NAD, mostraram o mesmo sítio de atividade apresentando uma reação de membrana interna mitocondrial. Raras cristas são vistas com reação. A intensidade da reação variou nas duas enzimas sendo forte com a β Hidroxibutirato e moderada com a α Glicerofosfato Desidrogenase.

3. Os dados obtidos de nossa investigação permitem concluir que não existem acentuadas diferenças no metabolismo respiratório do Trypanosoma cruzi, nas diferentes fases evolutivas por que passa nas células de miocárdio de embrião de pinto ou nas formas encontradas livres no meio.

LOCALIZAÇÃO HISTOENZIMOLÓGICA
REAÇÃO MITOCONDRIAL

	ENZIMA	Trypanosoma cruzi				Célula Hospedeira	
		Dentro da célula		Fora da célula			
		M.I.	C.M.	M.I.	C.M.	M.I.	C.M.
Ciclo de Krebs	SDH D	2	2	2	2	2	2
	IC D	3	3	3	3	3	3
	NADPH	3	3	3	3	3	3
	Cit.Oxi.	3	3	3	3	3	3
Via dos Lipídios	β HBD (NAD)	2	0	3	0	1	1
	α GDP (FAD)	1-2	0	2	0	1	1

As reações foram aferidas subjetivamente segundo o seguinte critério:

- 0 - Reação Negativa
- 1 - Reação Fraca
- 2 - Reação Moderada
- 3 - Reação Intensa

Nomenclatura:

- M.I. - Membrana Interna
- C.M. - Crista Mitochondrial

SUMÁRIO

Um estudo citoquímico a nível de microscopia ótica e eletrônica foi feito para localizar enzimas mitocondriais do Trypanosoma cruzi em culturas de tecido usando miocárdio de em brião de pinto infectado pela cepa Y. As seguintes desidrogenases foram reveladas pelo uso de sais de tetrazolio como aceptores de hidrogênio da reação: Succinato Desidrogenase (E.C.1.3.99.1), Isocitrato Desidrogenase (E.C. 1.1.42), α Glicerofosfato Desidrogenase (E.C. 1.1.2.1), β Hidroxibutirato Desidrogenase (E.C. 1.1.1.30) e NADPH tetrazolio Redutase (NADPH diaforase). A nível ótico a reação se revela intensa na forma de grãos de cor azul (sal NBT) localizados no citoplasma das células, em volta do núcleo e em todo o espaço citoplasmático útil nas células parasitadas.

Nas formas intracelulares esferomastigotas (amastigotas) e epimastigotas a reação se revela na forma de 5 a 7 grãos e nas formas livres de 8 a 15 grãos para as enzimas Isocitrato e Succinato Desidrogenases e NADPH tetrazolio Redutase.

A nível ultra-estrutural o produto eletrondenso (sal DS NBT) se localiza nas mitocôndrias da célula hospedeira na região das cristas e membrana interna mitocondriais. Nas formas intracelulares também a reação é de cristas e membrana interna em todas as regiões da mitocôndria do corpo celular.

Para as enzimas da via dos lipídios α Glicerofosfato e β Hidroxibutirato Desidrogenases a reação se revelou de membrana interna mitocondrial. Raras cristas são vistas com reação.

A atividade da Citocromo Oxidase (E.C. 1.9.3.1) foi melhor revelada utilizando-se Diaminobenzidina (DAB) como doador de hidrogênio da reação. A localização desta enzima na forma de grãos marrons no citoplasma celular e num produto eletrondenso nas cristas e membrana interna das mitocôndrias das células e parasitos intracelulares se revelou semelhante às das enzimas descritas acima: Isocitrato e Succinato Desidrogenases e NADPH tetrazolio Redutase.

SUMMARY

In order to locate the activity of mitochondrial enzymes in Trypanosoma cruzi in tissue cultures a cytochemical study at light and electron microscopic levels was performed using chick embryo heart muscle cultures infected by the Y strain of the parasite.

Tetrazolium salts were used as hydrogen acceptors of the reaction to locate Succinate Dehydrogenase (E.C. 1.3.99.1), Isocitrate Dehydrogenase (E.C. 1.1.42), α Glycerophosphate Dehydrogenase (E.C. 1.1.2.1), β Hydroxybutyrate Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.30) and NADPH Tetrazolium Redutase. Light microscopy showed an intense reaction. Blue granules (NBT salt) were seen within the cytoplasm of the cells in the region of the nucleus. In parasitized cells they were seen throughout the cytoplasm not occupied by parasites. Isocitrate Dehydrogenase, Succinate Dehydrogenase and NADPH Tetrazolium Redutase activity was revealed as 5 to 7 granules in the spheromastigotes (amastigote) and epimastigotes and as 8 to 15 granules in the trypomastigotes.

At the ultrastructural level the electrondense product (DS NBT salt) was concentrated in the host cell mitochondria at the region of the cristas and inner membrane. In the intracellular forms of the parasite the reaction also occurs at the cristae and inner membrane in all regions of the mitochondria.

For the lipid pathway enzymes α Glycerophosphate Dehydrogenase and β Hydroxybutyrate Dehydrogenase the reaction was mainly located at the inner membrane of the mitochondria. Few cristae were seen with the reaction.

Cytochrome Oxidase (E.C. 1.9.31.1) activity was best revealed with the use of diaminobenzidine (DAB) as hydrogen donor and sodium cacodylate (0.1M, pH 7.2) as buffer. At the host cells and intracellular parasites the activity was observed in the form of brown granules in the cytoplasm and as an electron dense product at the cristae and inner membrane of the mitochondria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSIN, M. & VON BRAND, T. Characterization and intracellular distribution of the Succinic Dehydrogenase of Trypanosoma cruzi. Expl.Parasitol. 4:548-563 (1955)
- AGOSIN, M. & WEINBACH, E.C. Partial purification and characterization of the Isocitric Dehydrogenase from Trypanosoma cruzi. Biochem. Biophys. Acta 21:117-126 (1956)
- ALVARENGA, N.J. Evolução do Trypanosoma cruzi no trato digestivo de Triatoma infestans. Tese submetida a Universidade de Minas Gerais para obtenção do grau de Mestre em Ciências (1974)
- ALLEN, R.D., DAVID, G.B. & NOMARSKI, G. The Zeiss- Nomarski differential interference equipment for transmitted-light microscopy. Zeitschrift fur wissenschaftliche Mikroskopie und unikroskopische Technik, Band 69, Heft 4 (1969)
- ALTMAN, F.P. An introduction to the use of tetrazolium salts in quantitative enzyme cytochemistry. Koch- Light Laboratories Ltd. Colnbrook, Bucks., England (1972)
- ANDERSEN, H. & HOYER, P.E. Studies in Succinate Dehydrogenase Histochemistry. Histochem. 35:173-188 (1973)
- ANDERSON, W.A., BARA, G. & SELIGMAN, A.M. The ultrastructural localization of Cytochrome Oxidase via Cytochrome c. J. Histochem. Cytochem 23:13-20 (1975)
- BAERNSTEIN, H.D. The enzyme systems of the culture form of Trypanosoma cruzi. Ann. N.Y. Acad. Sci. 56:982-994 (1953)
- BAERNSTEIN, H.D. A review of Electron Transport Mechanism in Parasitic protozoa. J.Parasit. 49:12-21 (1963)
- BALBER, A.E. & WARD, R.A. Diaminobenzidine Staining of the Mitochondrion of Trypanosoma brucei. J.Parasit. 58: 1004-1005 (1972)
- BARKA, T. & ANDERSON, P.J. Histoquímica Ed. Atika, Madrid (1967)

- BRACK, C. Elektronenmikroskopische untersughungen zum Lebenscycls von Trypanosoma cruzi. Acta Trop. 25:289-356 (1968)
- BRESLAU, E. & SCREMIN, L. Die Kerne der Trypanosomen und ihr verhaltenzur Nuclearreaktion. Archiv. für Protistenkunde 48:509-515 (1924)
- BRUNK, U.T. & ERICSSON, J.L.E. The demonstration of acid phosphatase in in vitro cultured tissue cells. Studies on the significance of fixation, tonicity and permeability. In: Fixation in Histochemistry (1972)
- CHACRAVARTY, N., SÁNCHEZ, M. & ERCOLI, N. Histochemical studies of Succinic Dehydrogenase in Trypanosoma cruzi and Leishmania leproide. Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 110: 517-521 (1962)
- CHAGAS, C. Nova Tripanosomiase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n.gen.sp. agente etiológico de nova entidade mórvida do homem. Mem.Inst. Oswaldo Cruz 1:159-218 (1909)
- COSGROVE, W.B. Cytochemical demonstration of mitochondrial enzymes in Kinetoplasts. Journal of Protozoology (Suplemento) 13, 16 (1966)
- DOCAMPO, R., BOISO, J.F. & STOPPANI, A.O.M. Tricarboxylic Acid Cycle Operation at the Kinetoplast-Mitochondrion Complex of Trypanosoma cruzi. Biochim.Biophys.Acta 502:466-476 (1978)
- DE SOUZA, W., ANGLUSTER, J. & BUNN, M.M. Cytochemical detection of Cytochromo Oxidase on the Mitochondrion-Kinetoplast Complex of Herpetomonas samuelpessoai. Influence of the growth medium. J.Submicr.Cytol. 9:355-361 (1977)
- DIAS, E. Estudo sobre o Schizotrypanum cruzi. Mem.Inst.Osw.Cruz 28:1-110 (1934)
- DOUGLAS, W.H.J., WHITTLE, W.L. & DELL'Orce, R.T. Cytochemical localization of Cytochrome Oxidase activity in monolayer cultures of human cells. J. Histochem.Cytochem. 24:630-633 (1976)

- ERNSTER, L. & NAVAIZIO, F. The cytoplasmic distribution of Isocitric dehydrogenases. *Exp.Cell Research* 11:483-510 (1956)
- FELIX, C.R., CALDAS, R.A., CERON, C.R. & ROITMAN, . Cyanide-sensitive and insensitive respiration of Trypanosoma cruzi. *Ann.Trop.Med.Parasit.* 72:89-91 (1978)
- FIGUEIREDO, Y.P. Metabolismo oxidativo de formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi. Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Microbiologia) (1973).
- FULTON, J.D. & SPOONER, D.F. Terminal respiration in certain mammalian Trypanosomes. *Exp.Parasit.* 8:137-162 (1959)
- GUTTERIDGE, W.E., COVER, B. & GABORAK, M. Isolation of blood and intracellular forms of Trypanosoma cruzi from rats and other redents and preliminary studies of their metabolism. *Parasitology* 76:157-176 (1978)
- GREEN, D.E., DEWAN, J.G. & LELOIR, L.F. The Hydroxybutyric Dehydrogenase of animal tissues. *Biochem.J.* 31:934-949 (1936)
- HANKER, J.S., KUSYK, C.J., CLAPP, D.H. & YATES, P.E. Effect of Dimethylsulfoxide (DMSO) on the Histochemical demonstration of Dehydrogenases. *J.Histoch. Cytochem.* 18:673 (1970)
- HILL, G.C. & ANDERSON, W.A. Electron transport systems and mitochondrial DNA in Trypanosomatidae: A Review. *Exp. Parasit.* 28:356-380 (1970)
- HILL, G.C. Characterization of the electron transport systems present during the life cycle of African Trypanosomes. In: *Biochemistry of parasites and Host- Parasite Relationships*, H. Van den Bossche Ed. (1978)
- HOARE, C.A. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph Blackwell Oxford (1972)

- KARNOVSKY, M.J. A formolaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J.Cell Biol. 27:137A (1965)
- KALLINIKOVA, V.D. Cytochemical study of enzymes of the respiratory chain in the life cycle of Trypanosoma cruzi Chagas, 1909.I. Enzymes of the respiratory chain at all stages of the life cycle in vivo and in culture. Acta Protozool. 5:395-403 (1968)
- KAISER., apud PEARSE, A.G.E.
- LEHMANN, D.L. & CLAFLIN, J.L. Cytochemical localization of some dehydrogenase in culture forms of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma ranarum. Ann.Trop.Med.Parasit. 59:17-18 (1965)
- LEHNINGER, A.L. The Mitochondrion. W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, California (1963).
- LEHNINGER, A.L. Biochemistry The Molecular Basis of cell structure and functions. Worth Publishers, Inc.(1970)
- LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. J. Biophys.Biochem.Cytol. 9:409 (1961)
- MASSEY., apud SIMPSON, L.
- MEYER, H. & OLIVEIRA, M.X. Cultivation of Trypanosoma cruzi in tissue cultures: a four year study. Parasitology 39:91-93 (1948)
- MEYER, H. Electron microscopic study of Trypanosoma cruzi in thin sections of infected tissue culture and of blood agar forms. Parasitology, 48:1-8 (1958)
- MEYER, H. The fine structure of the flagellum and Kinetoplast-Chondriome of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in tissue culture. J.Protozool. 15:614-621 (1968)
- MEYER, H. Further studies on the fine structure of the Kinetoplast-chondriome of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in thin sections of infected tissue cultures. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 11:48-56 (1969)

- MEYER, H. & De SOUZA, W. Electron Microscopic Study of Trypanosoma cruzi Periplast in Tissue Cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle. J. Protozool. 23:385-390 (1976)
- NACHLAS, M.M., WALKER, D.G. & SELIGMAN, M.D. A histochemical method for the demonstration of Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. J.Biophys.Biochem.Cyt. 4:29-38 (1958)
- OPPERDOES, F.R. Energy-related metabolism in Trypanosomes. Chapter 1, 7 Thesis, Laboratory of Biochemistry of University of Amsterdam (1977)
- PADRON, T.S. & De SOUZA, W. Ultrastructural localization of basic proteins in Trypanosoma cruzi. J. Histochem. Cytochem. 26:349-358 (1978)
- PAULIN, J.J. The chondriome of selected Trypanosomatids. J.Cell. Biol. 66:404-413 (1975)
- PAULIN, J.J. Crithidia fasciculata: Reconstruction of the mitochondrion based on serial thick sections and high-voltage electron microscopy. Exp.Parasit. 41:283-289 (1977)
- PEARSE, A.G.E. Histochemistry theoretical and Applied. 3rd ed. Vol. I, II. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, U.S.A. (1972)
- POSAKONY, J.W., ENGLAND, J.M. & ATTARDI, G. Morphological heterogeneity of HeLa cell mitochondria visualized by a modified diaminobenzidina staining technique. J.Cell Sci. 19:315-320 (1975)
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208 (1963)
- RINGLER, R.L. & SINGER, T.P. Studies on the mitochondrial glycerophosphate Dehydrogenase. J.Biol.Chem. 234(8): 2211-2217 (1959)
- RIOU, G.F., Gutteridge, W.E. Comparative study of kinetoplast DNA

- in culture, blood and intracellular forms of Trypanosoma cruzi. Biochimie 60:365-379 (1978)
- ROMAÑA, C. & MEYER, H. Estudo do ciclo evolutivo de "Schizotrypanum Cruzi" em cultura de tecidos de embrião de galinha. Mem.Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 37 (1942)
- ROULET, apud PEARSE, A.G.E.
- SCARPELLI, D.G., HESS, R. & PEARSE, A.G.E. The cytochemical localization of oxidative enzymes. I. Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase and Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. J. Biophysic. and Biochem.Cytol. 4:747-751 (1958)
- SEAMAN, G.R. The succinic Dehydrogenase of Trypanosoma cruzi. Expl. Parasitol. 2:236-241 (1953)
- SEAMAN, G.R. Succinate metabolism of Hemoflagellates. Expl. Parasitol. 5:138-148 (1956)
- SELIGMAN, A.M., NIR, I. & PLAPINGER, R.E. Cinnamyl-nitro- BT, a new osmiophilic tetrazolium salt for the ultrastructural demonstration of a variety of Dehydrogenases. J.Histochem. Cytochem. 18:673 (1970)
- SELIGMAN, A.M., KARNOVSKY, M.J., WASSERKRUG, H.L. & HANKER, J.S. Non droplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polimerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidina (DAB). J.Cell Biol. 38:1-13 (1968)
- SELIGMAN, A.M., NIR, I. & PLAPINGER, R.E. An osmiophilic Dystyryl ditetrazolium salt (DS-NBT) for ultrastructural dehydrogenase activity. J.Histochem.Cytochem. 19:273-285 (1975)
- SILVA, L.H.P. & NUSSENWEIG, V. Sobre uma cepa do Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin.Biol. São Paulo 20:191-201 (1953)
- SIMS, K.L., KAUFFMAN, F.C., JONHSON, E.C. & PICKEL, V.M. Cytochemical localization of brain Nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate (oxidized)-dependent dehydrogenases.

- Qualitative and quantitative distributions. J.Histochem. Cytochem. 22:7-19 (1974)
- SIMPSON, L. The kinetoplast of homoflagellates. Int. Rev.Cytol. 32:139-207 (1972)
- SHIPLEY, P.C. The vital staining of Trypanosoma lewisi with janus green. Anatomical Record 10:439-455 (1916)
- SPECTOR, G.J. The ultrastructural cytochemistry of lactic dehydrogenase succinic dehydrogenase, dihydro-nicotinamide adenine dinucleotide diaphorase and cytochrome oxidase activities in hair cell mitochondria of the guinea pig cochlea. J. Histochem. Cytochem. 23:216-234 (1975)
- STEINERT, M. Mitochondria associated with the kinetonucleus of Trypanosoma mega. J. Biophys.Biochem.Cytol. 8:542-546 (1960)
- VICKERMAN, K. The mechanism of cyclical development in Trypanosoma brucei sub group: An hypothesis based on ultrastructural observations. Trns. Roy.Soc.Trop.Med. Hyg.56:487-495 (1962)
- VICKERMAN, K. & PRESTON, T.M. Comparative cell biology of the Kinetoplastid Flagellates. Biology of Kinetoplastida Vol. 1, Ed. W.H.R. Lumsden & D.A. Evans Acad. Press (1976)
- VON BRAND, T. & JOHNSON, E.M. A comparative study of the effect of cyanide on the respiration of some Trypanosomidae. J. Cell Comp.Physiol. 29:33-49 (1946)
- VON BRAND, T. & AGOSIN, M. The utilization of Krebs cycle intermediates by the culture forms of Trypanosoma cruzi and Leishmania tropica. J. Infect. Dis. 97:274-279 (1955)
- WARTON, A. Cytochemical localization of Cytochrome oxidase activity in Trypanosoma cruzi on optical microscope and electron microscope level. Laboratory of Cytochemistry and Histochemistry, Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Polland Cong. Prot.(1977)

WATTENBERG, LEONG., apud PEARSE, A.G.E.

WISE, J. B. & LEHNINGER, A.L. The stability of mitochondrial D--
Hydroxybutyric Dehydrogenase and its relationship
to the respiratory chain. J. Biol. Chem. 237:1363-
1370 (1962)

Wu & Tsou, apud PEARSE, A.G.E.