

Rosana Catisti

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***Efeitos de Ácido Araquidônico na Homeostase
Intracelular de Cálcio***

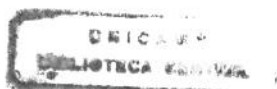
Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas da aluna **Rosana Catisti**.

Campinas, 17 de abril de 2001.

Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi
Orientador

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas, Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do Grau de Doutor em
Ciências Médicas - Ciências
Biomédicas.**

**Orientador: Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi
Área de Concentração: Patologia Clínica
Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP, Brasil – 2001**



Catisti

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/ UNICAMP
	C288e
V.	Ex.
TOMBO BC	44746
PROC.	16-392101
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 99,00
DATA	2010/01/01
N.º CPD	

CM00157828-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C288e Catisti, Rosana
Efeitos de ácido araquidônico na homeostase intracelular de cálcio
/ Rosana Catisti. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

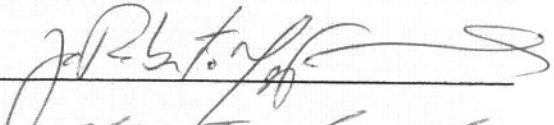
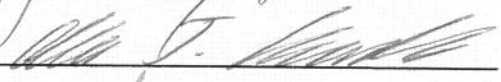
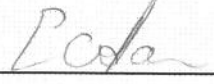
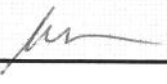
Orientador : Aníbal Eugênio Vercesi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Ácidos graxos. 2. Tripanossomos. 3. Mitocondria. 4. Cálcio.
I. Aníbal Eugênio Vercesi. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi

Membros:

1. Prof. Dr. José Roberto M. Fernandes - 
2. Prof. Dra. Clécia J. Kawatoski - 
3. Prof. Dra. Eliana C. de Jesus - 
4. Prof. Dr. André Ricardo Menicke - 
5. Prof. Dr. Aníbal E. Vercesi - 

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17.04.01

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a orientação do Prof. Aníbal Eugênio Vercesi, e no Department of Pathobiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, tendo sido financiado por auxílios concedidos pela CAPES, FAPESP, PRONEX, PADCT, CNPq, FAEP/UNICAMP.

*Aos meus pais,
com admiração, respeito, carinho e amor.*

Agradecimentos

Serei eternamente grata ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, por abrir-me as portas de seu laboratório, dar-me apoio, coragem, incentivo e orientação. Por enriquecer-me, com seus exemplos de amor à pesquisa e à vida. Ao Prof. Dr. Roberto Docampo pela atenção, carinho e acolhida em seu laboratório. Ao Dr. Roger Frigério Castilho pela ajuda crítica e apoio nos muitos momentos difíceis.

Aos colegas de laboratório agradeço pela colaboração em meu amadurecimento. Ao Ricardo, agradeço pelo auxílio com os computadores e às meninas Cláudia, Elisângela e Edilene, pela ajuda técnica. Ao Endrigo, com saudades.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos meus irmãos, pelo incentivo, carinho e amizade. Em especial, à Glória, pela ajuda com correções do português.

À minha filha Lígia, ☆ estrela ☆ do meu caminho, pela paciência, companheirismo, carinho, amizade e amor.

A Deus, pela força.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	16
RESUMO.....	19
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	21
1.1. Homeostase Intracelular de Cálcio.....	21
1.2. Transporte de Cálcio pela Mitocôndria.....	23
1.3. Transição de Permeabilidade da Membrana Mitocondrial.....	27
1.4. Produção Mitocondrial de Espécies Reativas de Oxigênio	28
1.5. Transição de Permeabilidade da Membrana Mitocondrial Induzida em Condições de Estresse Oxidativo.....	31
1.6. Possíveis Ações de Ca^{2+} no Processo de Permeabilização da Membrana Mitocondrial Interna.....	36
1.7. Ordem Kinetoplastida.....	37
1.8. Gênero <i>Trypanosoma</i>	40
1.9. Gênero <i>Leishmania</i>	45
1.10. Tratamento e Prevenção de Doenças Parasitárias.....	48
1.11. Biossíntese e Metabolismo de Ácidos Graxos.....	49
1.12. Ácido Araquidônico.....	50
2. OBJETIVOS.....	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1. Reagentes e Soluções.....	57
3.2. Métodos	
3.2.1. Cultura de Células.....	58
3.2.2 Isolamento de Mitocôndrias Hepáticas	58
3.2.3. Dosagem de Proteína.....	59
3.2.4. Consumo de Oxigênio Mitocondrial.....	59
3.2.5. Transporte de Cálcio por Mitocôndrias	59
3.2.6. Determinação do Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial.....	60

3.2.7. Determinação da Concentração de Cálcio Citosólico.....	61
3.2.8. Determinação do Estado Redox do NAD(P).....	62
3.2.9. Atividade da Bomba de Prótons.....	62
3.2.10. Métodos Estatísticos.....	62
4. RESULTADOS.....	63
4.1. 1º Trabalho.....	63
4.1.1 Resumo do 1º Trabalho.....	63
4.1.2 Introdução ao 1º Trabalho.....	64
4.1.3. The participation of pyridine nucleotides redox state and reactive oxygen in the fatty acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria.....	67
4.1.4. Discussão do 1º Trabalho.....	75
4.2. 2º Trabalho.....	79
4.2.1 Resumo do 2º Trabalho.....	79
4.2.2 Introdução ao 2º Trabalho.....	80
4.2.3. Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids.....	83
4.2.4. Discussão do 2º Trabalho.....	97
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	101
6. SUMMARY.....	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
8. APÊNDICE – CURRICULUM VITAE.....	137

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Esquema Sumarizando os Mecanismos de Transporte de Ca^{2+} Localizado nas Membranas Plasmática, Nuclear, Mitocondrial e do Retículo Endo(sarco)plasmático em Célula de Mamífero.....	22
Figura 2 - Produção Mitocondrial de Espécies Reativas de Oxigênio e Principais Defesas Antioxidantes.....	29
Figura 3 – Principais Formas Evolutivas da Família Trypanosomatidae. A, Amastigota; B, Promastigota; C, Coanomastigota; D, Epimastigota; E, Tripomastigota; F, Opistomastigota (REY, 1991).....	39
Figura 4 – Ciclo Evolutivo de <i>Trypanosoma brucei</i> (VICKERMAN, 1969).....	43
Figura 5 – Diagrama do Ciclo Evolutivo de <i>Leishmania sp</i> (BRAY, 1974).....	47
Figura 6 – Interação Metabólica de Ácidos Graxos no Corpo Humano. Localização Subcelular do Metabolismo de Lipídeos em Células de Animais Vertebrados e em Leveduras.....	50
Figura 7 – Metabolismos de Hidrólise de Fosfolipídeos: Ácido Araquidônico e Alguns de seus Derivados Eicosanóides.....	53

1º TRABALHO

Figura 1.1. Mitochondrial Membrane Potential Collapse Induced by AA and FCCP: the Effects of ADP, Catalase, Carboxyatractyloside, DTT, EGTA, CsA and Rotenone.....	70
Figura 1.2. Mitochondrial NAD(P)H Oxidation Induced by AA or FCCP.....	71

Figura 1.3. Release of State 4 Respiration by AA or FCCP.....	71
Figura 1.4. NAD(P) ⁺ Reduction Induced by Rotenone and NAD(P)H-linked Substrates.....	71
Figura 1.5. Rotenone or NAD(P)H-linked Substrates Added After the Initial Protonophoric Effect of AA or FCCP Prevent $\Delta\Psi$ Disruption in Ca ²⁺ -loaded RLM.....	71
Figura 1.6. Mitochondrial Ca ²⁺ Release Induced by AA or FCCP: Effects of β -hydroxybutyrate plus Isocitrate or Rotenone.....	72
 2º TRABALHO	
Figura 2.1. Melittin Increases [Ca ²⁺] _i in <i>T. brucei</i> procyclic trypomastigotes.....	88
Figura 2.2. Melittin Stimulates Ca ²⁺ entry into <i>L. donovani</i> promastigotes.....	89
Figura 2.3. Melittin Stimulates Ca ²⁺ entry into <i>T. cruzi</i> amastigotes.....	89
Figura 2.4. Arachidonic Acid Stimulates Ca ²⁺ Entry Into Trypanosomatids.....	90
Figura 2.5. The Arachidonic Acid-induced Ca ²⁺ Influx was Inhibited by LaCl ₃ , but not by Ibuprofen.....	90
Figura 2.6. Effect of Different Arachidonic Acid Concentrations on [Ca ²⁺] _i in <i>T. brucei</i> procyclic trypomastigotes Incubated in the Absence of Ca ²⁺	90
Figura 2.7. Arachidonic Acid Stimulates Ca ²⁺ and Acridine Orange Release from Acidocalcisomes in permeabilized <i>T. brucei</i> procyclic trypomastigotes.....	91
Figura 2.8. Arachidonic Acid-induced Decrease in Membrane Potential and Ca ²⁺ Release from Mitochondria in permeabilized <i>T. brucei</i> procyclic trypomastigotes.....	92

CONCLUSÕES GERAIS

Figura 8 – Mecanismo de Abertura do Poro de Transição de Permeabilidade (PTP) por Ácido Graxo.....103

Figura 9 – Esquema Sumarizando Efeitos de Ácido Araquidônico, na Membrana Plasmática e nas Organelas Intracelulares de Tripanossomatídeos.....105

TABELAS

Tabela I – Espécies de Tripanossomas Africanos, seus Hospedeiros Vertebrados e Doenças por Eles Causadas.....42

Tabela II – Distribuição Geográfica e Manifestações Clínicas Causadas por Diferentes Espécies de *Leishmania*.....46

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\psi$ - Potencial elétrico transmembrana

$[Ca^{2+}]_i$ – Concentração de cálcio intracelular

A₂₃₁₈₇ - Ionóforo de cálcio **A₂₃₁₈₇**

AA – Ácido araquidônico

ADP - Adenosina difosfato

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

AMP - Adenosina monofosfato

ANT – Translocador de nucleotídeo de adenina

Anti A – Antimicina A

AO – Alaranjado de acridina

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - Soro albumina bovina

CAT – Carboxiatractilosídeo

Cat – Catalase

CGDH – Desidrogenase cetoglutárica

Ciclo ATC – Ciclo do ácido tricarboxílico

COX - Ciclooxygenase

CsA – Ciclosporina A

CyP-D – Ciclofilina D

DAG – Diacilglicerol

DAINEs – Drogas antiinflamatórias não esteroidais

Diamida - Ácido azodicarboxílico bis [dimetilamida]

DIDS - Ácido 4,4'-diisotiocianatostilbene-2,2'-disulfônico

- Dig** - Digitonina
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DTT** – Ditioneitol
- EDTA** - Ácido ethylenediamine tetraacético
- EGTA** - Ácido ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio
- FA** – Ácidos graxos
- FCCP** - Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazone
- GP** – Glutathione peroxidase
- GP** – Glutathione reductase
- GSH** – Glutathione reduzida
- GSSG** – Glutathione oxidada
- GTP** – Guanosina 5'-trifosfato
- H₂O₂** – Peróxido de hidrogênio
- HDL** – Lipoproteína de alta densidade
- HEPES** - Ácido (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfônico])
- HMG** – β hidroxil β metil glutamato
- ICDH** – Desidrogenase isocítrica
- IP₃** – Inositol 1,4,5-trifosfato
- LaCl₃** – Cloreto de lantânio
- LDL** – Lipoproteína de baixa densidade
- MFR** - Mitocôndrias isoladas de fígado de rato
- mtDNA** - DNA mitocondrial
- NAD(P)⁺** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
- NAD(P)H** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

Nig – Nigericina

NP – Nucleotídeos de piridina

O₂[•] - Radical ânion superóxido

OBAA – Ácido 3-(4-octadecil)-benzoilacrílico

OH⁻ - Ânion hidroxil

OH[•] - Radical hidroxil

PDH – Desidrogenase pirúvica

Pi - Fosfato inorgânico

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PL_C – Fosfolipase C

PL_D – Fosfolipase D

PTP - Poro de transição de permeabilidade

S - Safranina

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

-SH - Grupo sulfidril

SOD - Superóxido dismutase

Suc- Succinato

TH - Transidrogenase

TMPD - N,N,N',N'-tetrametyl-*p*-phenylenediamine

TPM - Transição de permeabilidade da membrana mitocondrial

TRIS - Tris(hydroxymethyl)aminomethane

UcP2 – Proteína desacopladora 2

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

O íon cálcio exerce papel essencial no controle de uma série de funções celulares, porém seu excesso pode desencadear tanto a morte celular programada (apoptose) quanto a acidental (necrose). Para avaliarmos os efeitos de ácido araquidônico (AA) na homeostase intracelular de cálcio, utilizamos dois modelos experimentais: mitocôndrias isoladas de fígado de rato e tripanossomatídeos. Comparamos a capacidade de abertura do poro de transição de permeabilidade, utilizando-se concentrações de AA e de carbonil cianeto *p*-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP) capazes de causar, de modo similar, a dissipação do potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi$) em mitocôndrias de fígado de rato, na presença de cálcio e do substrato respiratório succinato. O efeito protonofórico de AA e FCCP foi muito pouco modificado por carboxiatractilosídeo. A abertura do poro de transição de permeabilidade, induzida por AA ou FCCP, mostrou ser sensível a catalase, EGTA, ADP, ditiotreitól, ciclosporina A, rotenona e por substratos respiratórios. Isto indica que a condição de estresse oxidativo associada ao estado oxidado dos nucleotídeos de piridina leva à oxidação de tióis das proteínas de membrana, abrindo o poro. Investigamos também o mecanismo de ação de AA na mobilização intracelular de cálcio, em formas tripomastigotas procíclicas de *Trypanosoma brucei*, promastigotas de *Leishmania donovani* e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Verificamos que o influxo de cálcio é estimulado pela melitina, e bloqueado pelo inibidor da fosfolipase A₂ ácido 3-(4-octadecil)-benzoilacrílico (OBAA). AA induz o influxo de cálcio, num mecanismo sensível a LaCl₃. Entretanto, melitina e AA induzem um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ em *T. brucei*, quando incubados em meio livre de Ca^{2+} , indicando mobilização de Ca^{2+} de organelas intracelulares. Essa hipótese foi sugerida pelos experimentos mostrando que AA promove liberação de Ca^{2+} de acidocalcisomas nestas células. Os resultados mostrando mudanças no potencial de membrana mitocondrial, liberação de alaranjado de acridina e

Ca^{2+} dos acidocalcisomas, e transporte de Ca^{2+} através da membrana plasmática, sugerem que, em adição à possível estimulação nos processos mediados por canais de Ca^{2+} , AA, na faixa de concentração aqui utilizada, tem outros efeitos não específicos em membranas de tripanossomatídeos.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Homeostase Intracelular de Cálcio

O íon cálcio exerce papel essencial no controle de uma série de funções celulares tais como secreção, contração, ativação de enzimas, regulação do ciclo celular (BERRIDGE, 1997). Para exercer estas funções é necessário que sua distribuição nos compartimentos extra e intracelulares seja regulada por mecanismos de alta precisão e que possam ocorrer rápidas flutuações na concentração do íon, graças a processos mediados de transporte através das membranas (Fig. 1).

A concentração de Ca^{2+} livre no citosol (da ordem de 10^{-7} M) é mantida cerca de 10.000 vezes abaixo da concentração extracelular (da ordem de 10^{-3} M). Este alto gradiente eletroquímico de Ca^{2+} entre os compartimentos intra e extracelulares é essencial para a sua função como carregador de sinais bioquímicos ao interior das células. Isto permite que a abertura de canais específicos da membrana seja acompanhada de rápida entrada de Ca^{2+} , levando a mensagem ao interior da célula (IRVINE, 1986; CARAFOLI, 1987, BERRIDGE, 1997).

A distribuição do Ca^{2+} intracelular é controlada por processos de transporte do íon através da membrana plasmática e das membranas de organelas subcelulares, como o retículo endo(sarco)plasmático, a mitocôndria e o núcleo.

A membrana plasmática possui mecanismos de entrada de Ca^{2+} na célula mediados por canais voltagem-dependentes ou regulados por segundo mensageiros (BERRIDGE, 1997); enquanto que o efluxo ativo do íon é promovido por uma Ca^{2+} -ATPase, que hidrolisa um ATP por Ca^{2+} translocado (CLARK & CARAFOLI, 1983; CARAFOLI, 1989; CARAFOLI, 1994), ou por um sistema de trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que troca um Ca^{2+} interno por três Na^+ externos, utilizando energia do potencial do gradiente eletroquímico de Na^+ (REEVES, & HALE, 1984). Este último é particularmente ativo em tecidos excitáveis

(CARAFOLI, 1989) e, dependendo do gradiente de Na^+ , pode atuar no influxo de Ca^{2+} celular (REEVES & CHEON, 1989).

O retículo endo(sarco)plasmático é considerado o principal reservatório de Ca^{2+} intracelular, e possui vias independentes para entrada e saída do íon. O influxo é catalizado pela Ca^{2+} -ATPase, que transloca dois íons Ca^{2+} para cada ATP hidrolisado (DEMEIS & VIANNA, 1979). A via de liberação tem sido caracterizada como um canal estimulado por inositol-1,4,5-trifosfato (ENGLAND, 1986; CARAFOLI, 1987; BERRIDGE, 1987), que funciona como segundo mensageiro para liberar Ca^{2+} do retículo endoplasmático (BERRIDGE, 1989), e por cafeína (receptor de rianodina) em retículo sarcoplasmático (SORRENTINO & VOLPE, 1993).

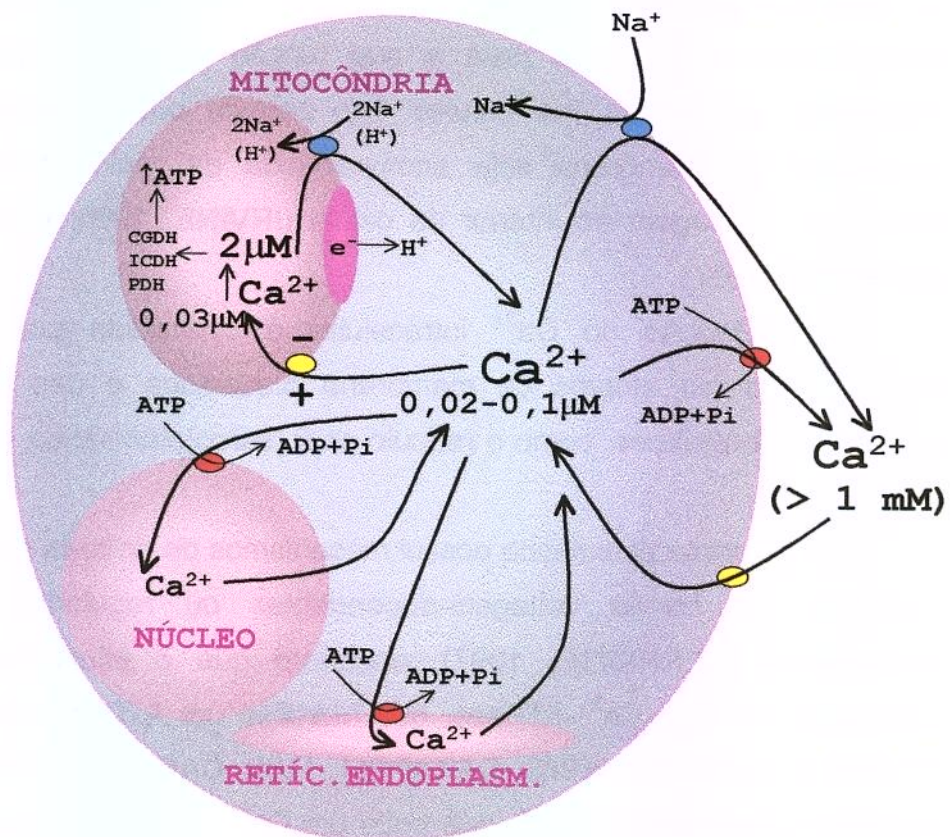


Fig. 1 - Esquema sumarizando os mecanismos de transporte de Ca^{2+} localizado nas membranas plasmática, nuclear, mitocondrial e do retículo endo(sarco)plasmático em uma célula de mamífero.

Foi demonstrado que núcleos isolados de hepatócitos captam Ca^{2+} através de uma Ca^{2+} -ATPase semelhante à do retículo endoplasmático (LANINI *et al*, 1992) por um processo acoplado à hidrólise de ATP (NICOTERA *et al*, 1989). Estes mesmos autores sugerem que o núcleo também participe na regulação da concentração de Ca^{2+} citosólico (NICOTERA *et al*, 1990, 1992).

Tem sido amplamente demonstrado que modificações funcionais em alguns destes translocadores de Ca^{2+} podem causar alterações na manutenção da homeostase intracelular de Ca^{2+} , levando à morte celular (FARBER, 1981; JEWELL *et al*, 1982; ORRENIUS *et al*, 1989). Por exemplo, um aumento prolongado da concentração do Ca^{2+} citosólico pode induzir a formação de numerosas evaginações na membrana das células, que parece refletir a ativação de enzimas catabólicas dependentes de Ca^{2+} , tais como fosfolipases, endonucleases e proteases (LEMASTERS *et al*, 1987; ORRENIUS *et al*, 1989; TRUMP & BEREZESKY, 1995).

1.2. Transporte de Cálcio pela Mitocôndria

O transporte de Ca^{2+} mitocondrial foi descrito no início da década de 1960, simultaneamente por De Luca & Engstrom (1961) e Vasington & Murphy (1962). Sabe-se agora que mitocôndrias de quase todos os tecidos animais vertebrados e invertebrados (CARAFOLI & CROMPTON, 1978; NICHOLLS & ÅKERMAN, 1982; HANSFORD, 1985; MCCORMACK & DENTON, 1986; GUNTER & PFEIFFER, 1990), de alguns fungos e, de alguns tecidos vegetais (MARTINS & VERCESI, 1985; MARTINS *et al*, 1986; CARNIERI *et al*, 1987; VERCESI *et al*, 1989; RUGOLO *et al*, 1990) e de protozoários (DOCAMPO & VERCESI, 1989A,B; VERCESI *et al*, 1991A, 1991B, 1993A, 1993B; DOCAMPO *et al*, 1993) captam Ca^{2+} do meio externo por um processo ativo. Esse transporte é mediado por um complexo sistema que compreende dois mecanismos: de influxo e de efluxo, este último ocorrendo por duas vias distintas, o efluxo Na^+ -dependente (CROMPTON *et al*, 1976) e o efluxo Na^+ -independente (ROTTEMBERG & SCARPA, 1974; PUSKIN *et al*, 1976; BYGRAVE, 1977;

ÁKERMÁN & NICHOLLS, 1983; GUNTER & PFEIFFER, 1990). O influxo ocorre por um processo eletroforético, em resposta ao potencial elétrico de membrana, negativo internamente, gerado pela atividade da cadeia respiratória ou hidrólise de ATP pela ATPase mitocondrial (GUNTER & PFEIFFER, 1990). O translocador de influxo de Ca^{2+} na membrana mitocondrial interna é sensível a vermelho de rutênio e lantanídeos (ver revisão GUNTER *et al*, 1994) e tem afinidade relativamente baixa pelo Ca^{2+} , com K_m entre 10 e 30 μM , dependendo da origem da mitocôndria e da composição do meio de reação (SARIS & ÁKERMÁN, 1980; NICHOLLS & ÁKERMÁN, 1982; VERCESI, 1984A). Este transportador também liga e transporta outros cátions bivalentes com a seguinte afinidade: Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} (ver revisão GUNTER *et al*, 1994). Estes são similares ao Ca^{2+} e agem como inibidores competitivos. O vermelho de rutênio é um potente inibidor não competitivo da via de influxo com um K_i de cerca de 30 nM (REED & BYGRAVE, 1974, A, B; GUNTER *et al*, 1994).

Dois mecanismos de efluxo têm sido identificados em mitocôndrias de vertebrados, o processo Na^+ -dependente, que é principalmente ativo em tecidos excitáveis, e troca um íon Ca^{2+} interno por dois íons Na^+ externos (BRAND, 1985B; LI *et al*, 1992) e o processo Na^+ -independente, que ocorre em mitocôndrias de uma maneira geral e opera por uma via que troca um íon Ca^{2+} por dois H^+ externos (ÁKERMÁN, 1978; NICHOLLS, 1978; BRAND, 1985A). Estes translocadores apresentam velocidades máximas de efluxo de aproximadamente 1 e 5 nmoles/mg de proteína/min, respectivamente (VINAGRADOV & SCARPA, 1973; ANTONIO *et al*, 1991). Algumas características da via Na^+ -independente indicam que a mesma não se comporta como uma via passiva de troca 1 Ca^{2+} /2 H^+ (GUNTER *et al*, 1983; GUNTER & PFEIFFER, 1990): 1) grande variação na estequiometria $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, quando medidas em meios com diferentes pH; 2) falta de estímulo com aumento no gradiente de pH; 3) ausência da troca Ca^{2+} - Ca^{2+} . O K_m aparente para o efluxo de Ca^{2+} é da ordem de 5 a 10 μM , tanto para a via Na^+ -dependente, quanto para a via Na^+ -independente (COLL *et al*, 1982). Apesar das baixas concentrações destas proteínas na membrana mitocondrial, elas já foram isoladas e

reconstituídas em lipossomas. Os dados cinéticos obtidos com estas proteínas reconstituídas estão de acordo com os valores encontrados em mitocôndrias intactas (GARLID, 1994).

O efluxo de Ca^{2+} mitocondrial pode também ocorrer pelo reverso da via de entrada eletroforética. Isto pode ser observado quando a concentração de Ca^{2+} externo é diminuída com o uso de quelantes, como EGTA ou EDTA, pela redução do potencial elétrico de membrana causada por desacopladores, como dinitrofenol e FCCP, ou por inibidores da respiração, como rotenona, antimicina A e cianeto (NICHOLLS & ÅKERMANN, 1982). Este efluxo também pode ser induzido pelo uso de oligomicina, quando o transporte de Ca^{2+} usa energia de hidrólise de ATP (NICHOLLS & ÅKERMANN, 1982).

A distribuição do íon Ca^{2+} entre o espaço intra e extramitocondrial em condições de equilíbrio é cineticamente regulada pelo movimento cíclico contínuo do mesmo através das vias de influxo e efluxo (NICHOLLS, 1978; NICHOLLS & ÅKERMANN, 1982). Este movimento cíclico ocorre em velocidades muito baixas, em condições fisiológicas, devido ao alto K_m para influxo e baixa velocidade para o efluxo e mantém o Ca^{2+} livre extramitocondrial na faixa de 0,5 a 1,0 μM (NICHOLLS, 1978; COLL *et al*, 1982). A habilidade da mitocôndria, particularmente na presença de Mg^{2+} e ATP, em tamponar o cálcio externo na faixa de concentração, que se acreditava bastante próxima à encontrada no citosol *in vivo*, levou muitos investigadores a propor uma função importante a essa organela, na regulação da concentração de cálcio livre citosólico (NICHOLLS, 1978; FISKUM & LEHNINGER, 1979; ÅKERMANN & NICHOLLS, 1983). Entretanto, estudos mais recentes, mostram que o cálcio mitocondrial total de células normais *in vivo* é de aproximadamente 0,2 - 4,0 nmoles/mg de proteína mitocondrial, o que corresponde a concentrações entre 0,1 - 2,0 μM de Ca^{2+} livre na matriz (HANSFORD & CASTRO, 1982; SOMLYO *et al*, 1985). Estes dados são incompatíveis com as características cinéticas dos translocadores, que estariam envolvidos na regulação mitocondrial do Ca^{2+} citosólico e indicam que, nas condições de repouso, o translocador de influxo mitocondrial de Ca^{2+} é totalmente inoperante (HANSFORD, 1985; CARAFOLI,

1987; MCCORMACK *et al*, 1990). Outros estudos com mitocôndrias *in situ*, em neurônios gigantes de lula, indicaram que, nestas células, as características do transporte de Ca^{2+} por mitocôndria são similares às observadas em estudos com mitocôndrias isoladas, quando as concentrações de Ca^{2+} citoplasmáticas eram muito superiores às concentrações fisiológicas (BRINLEY *et al*, 1977; BRINLEY *et al*, 1978). Estes estudos demonstraram, porém, que em concentrações de 50 - 100 nM, consideradas fisiológicas pelos autores para estas células em condições de repouso, a velocidade de captação de Ca^{2+} em condições fisiológicas, era praticamente desprezível.

É amplamente aceito atualmente, que a principal função do sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial é regular a concentração de Ca^{2+} livre na matriz mitocondrial em faixas de concentrações compatíveis com o estímulo da atividade de algumas enzimas regulatórias do ciclo de Krebs (HANSFORD, 1985; CARAFOLI, 1987; MCCORMACK *et al*, 1990). Quando a concentração de Ca^{2+} citosólica aumenta em resposta a algum estímulo externo, como por exemplo, sob a ação de hormônios que ativam processos que demandam energia (secreção, contração e outros), este sistema de captação de Ca^{2+} se torna operativo. Assim a concentração de Ca^{2+} intramitocondrial também aumenta, na faixa de 0,03 a 2,0 μM , com o objetivo de estimular três desidrogenases (pirúvica, cetoglutarica e isocítrica), que catalizam reações regulatórias do ciclo de Krebs. Isto resulta em estímulo da produção de ATP para suprir a demanda energética do processo celular estimulado pelo hormônio (HANSFORD, 1985; MCCORMACK & DENTON, 1986). O $K_{0,5}$ encontrado para a ativação dessas desidrogenases pelo Ca^{2+} está na faixa de 0,2 a 1,0 μM , dependendo da origem das mitocôndrias e das condições empregadas (para revisão ver Hansford, 1991). O mecanismo de ativação pelo Ca^{2+} é alostérico para a NAD-isocitrato desidrogenase (DENTON *et al*, 1978) e α -cetoglutarato desidrogenase (MCCORMACK & DENTON, 1986). O mecanismo de ativação para a piruvato desidrogenase é indireto e mediado pela ativação da fosfatase que remove grupos fosforil de resíduos de serina da forma inativa da enzima (TEAGUE *et al*, 1982). Devido a esse efeito do Ca^{2+} , o mecanismo de controle

respiratório pelo ADP, proposto por Chance & Williams, em 1956, foi ampliado em termos da disponibilidade de ADP e Ca^{2+} (HANSFORD, 1985; MCCORMACK & DENTON, 1986).

1.3. Transição de Permeabilidade da Membrana Mitocondrial (TPM)

Sabe-se que o acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) por mitocôndrias pode levar a uma permeabilização inespecífica da membrana mitocondrial interna (NICHOLLS & ÅKERMANN, 1982; GUNTER & PFEIFFER, 1990). Em 1976, Hunter e colaboradores sugeriram que este aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial era reversível e denominou-o de “Transição de Permeabilidade da Membrana Mitocondrial - TPM” (HUNTER *et al*, 1976). Estudos posteriores evidenciaram vários potenciadores da transição de permeabilidade induzida por Ca^{2+} , tais como: fosfato inorgânico (Pi), arsenato, ácidos graxos e oxidantes de tióis, chamados como “agentes liberadores de Ca^{2+} ou indutores” (NICHOLLS & ÅKERMANN, 1982; GUNTER *et al*, 1994 ; ZORATTI & SZABÒ, 1995). Foram identificados também agentes que protegem a mitocôndria contra o efeito do cálcio, tais como ADP, ATP, magnésio, anestésicos locais e redutores de dissulfeto. Pesquisadores sugeriram que a permeabilização da membrana mitocondrial por cálcio poderia ser estimulada pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina, e revertida pela redução desta coenzima (LEHNINGER *et al* , 1978; VERCESI *et al*, 1978). Esta descoberta estimulou muitos grupos a trabalhar neste tema, utilizando mitocôndrias isoladas (GUNTER & PFEIFFER, 1990), células isoladas (BELLOMO *et al*, 1982) e até órgãos perfundidos (SIES, 1986). Estes estudos estabeleceram uma importante relação entre o poder redutor mitocondrial e a transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (TPM) (RICHTER & FREI, 1988). Trabalhos recentes sugerem que a TPM é uma condição regulada por cálcio através da abertura de um canal proteico sensível a ciclosporina A (o poro de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial PTP) (GUNTER *et al*, 1994, ZORATTI & SZABÒ, 1995; CROMPTON *et al*, 1988; BROEKEMEIER *et al*,

1989) que permite um equilíbrio de solutos com peso molecular de até 1500 Da (HUNTER *et al*, 1976). A conformação fechada deste poro é favorecida pelo alto potencial elétrico transmembrana (BERNARDI, 1992) e acidificação da matriz (BERNARDI *et al*, 1992). Tem sido proposto que o PTP possa operar em condições patológicas, tais como na isquemia/reperfusão (NAZARETH *et al*, 1991; PASTORINO *et al*, 1993) ou mesmo em condições fisiológicas (BRUSTOVETSKY *et al*, 1993; BERNARDI *et al*, 1994). Recentemente algumas revisões sobre a regulação (GUNTER *et al*, 1994; ZORATTI & SZABÒ, 1995; BERNARDI *et al*, 1994) e características eletrofisiológicas (ZORATTI & SZABÒ, 1995) do PTP foram publicadas. O estudo desenvolvido em nosso laboratório vem dando ênfase sobretudo à participação de espécies reativas de oxigênio e oxidação de grupos tióis proteicos na TPM.

Apesar da existência de muitos estudos, o papel da TPM ainda permanece desconhecido. É proposto que a TPM participe de funções mitocondriais fisiológicas (BRUSTOVETSKY *et al*, 1993; BERNARDI *et al*, 1994; BERNARDI & PETRONILLI, 1996) tais como eliminar o excesso de Ca^{2+} da matrix, permitir o transporte de proteínas ou até mesmo em mecanismos de geração de calor. Por outro, as características inespecíficas da TPM, levando ao inchamento coloido-osmótico da matrix mitocondrial (para revisão ver GUNTER & PFEIFFER, 1990) e finalmente, perda de proteínas da matrix (IGBAVBOA *et al*, 1989), são incompatíveis com a manutenção da integridade mitocondrial. Neste contexto, várias evidências indicam que o PTP possa estar relacionado com o dano e morte celular em situações de estresse oxidativo, como na isquemia/reperfusão (NAZARETH *et al*, 1991; PASTORINO *et al*, 1993; GRIFFITHS & HALESTRAP, 1995).

1.4. Produção Mitocondrial de Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de espécies reativas de oxigênio por mitocôndrias é um evento fisiológico e contínuo em condições aeróbicas (Fig. 2). É calculado que até 2% do total de oxigênio consumido resulta na geração de ânion superóxido

($O_2^\bullet$) na NADH-coenzima Q e coenzima QH_2 -citocromo C desidrogenases (complexos I, II e III) (BOVERIS *et al*, 1972; CADENAS *et al*, 1977), devido à redução monoelétrica do O_2 . Apesar da moderada reatividade do $O_2^\bullet$ em solução aquosa, este pode gerar uma espécie reativa de oxigênio altamente citotóxica, o radical hidroxil ($HO^\bullet$), através da clivagem homolítica e redutora do H_2O_2 , um produto da dismutação do $O_2^\bullet$ (DUNFORD, 1987). É provável que a maior parte do $HO^\bullet$ gerado *in vivo* seja resultado da Reação de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO^\bullet + HO^-$) (SUTTON & WINTERBOURN, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

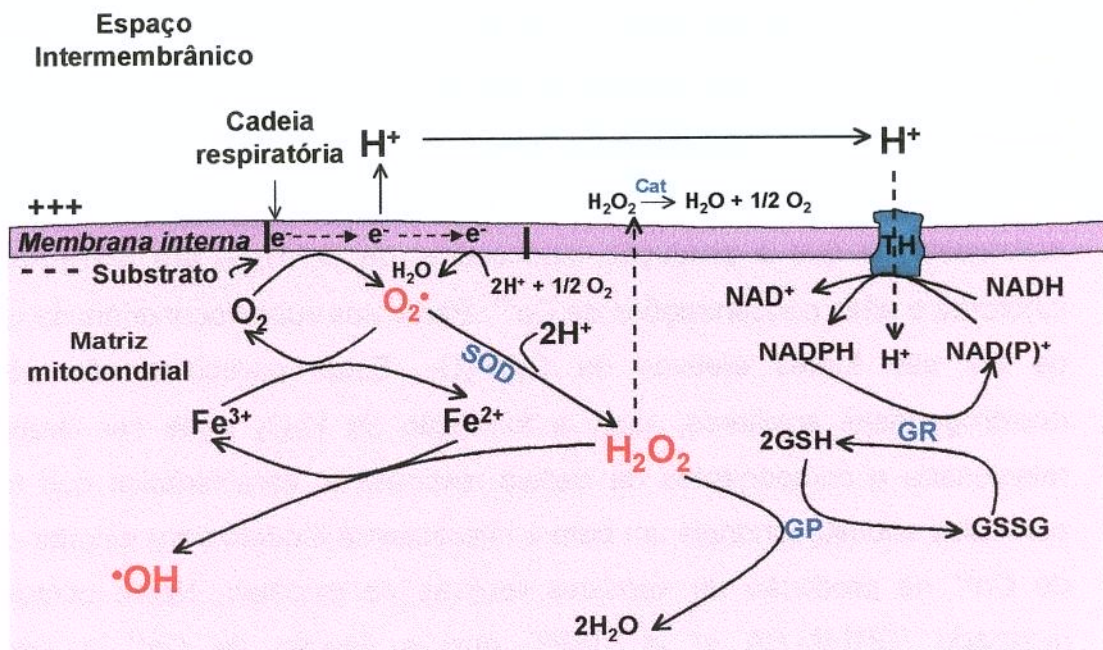


Fig. 2 - Produção Mitocondrial de Espécies Reativas de Oxigênio e Principais Defesas Antioxidantes.

A mitocôndria possui um eficiente sistema de defesa antioxidante (Fig. 2), representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase, glutathione redutase, NAD(P)-transidrogenase, e outros componentes tais como glutathione (GSH), NADPH, vitaminas E e C (HALLIWELL *et al*, 1989; VERCESI &

HOFFMANN, 1993). Apesar da catalase constituir a principal defesa citosólica contra o H_2O_2 , ela foi detectada somente em mitocôndrias de coração de rato (RADI *et al*, 1991; PHUNG *et al*, 1994). Em condições fisiológicas, os sistemas oxidantes e antioxidantes da organela estão em equilíbrio, mas em condições nas quais um excesso de espécies reativas de oxigênio é produzido e/ou o sistema antioxidante de defesa está depletado, um estado de estresse oxidativo é gerado. Quando ocorre um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, muitas alterações oxidativas de componentes da membrana mitocondrial podem ocorrer, tais como peroxidação lipídica e oxidação de tióis proteicos, levando à permeabilização e disfunção mitocondrial (VERCESI & HOFFMANN, 1993). Nosso grupo demonstrou que a TPM causada por Ca^{2+} ou Ca^{2+} na presença de diferentes indutores é devida a um aumento na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio e caracterizada pela oxidação de tióis de proteínas de membrana (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

Em 1980, Cadenas e Boveris (CADENAS & BOVERIS, 1980) demonstraram que a produção mitocondrial de $O_2^{\bullet}/H_2O_2$ era aumentada por ionóforos e altas concentrações de Ca^{2+} . Partículas submitocondriais de coração de boi são fontes efetivas de $O_2^{\bullet}/H_2O_2$. Estas partículas não possuem desidrogenases auxiliares; logo, a formação de H_2O_2 pode ser diretamente relacionada a componentes da cadeia respiratória, característica que faz das partículas submitocondriais um bom e interessante modelo para estudar o efeito de Ca^{2+} na produção de espécies reativas de oxigênio. Neste contexto, foi mostrado (GRIJALBA *et al*, 1999) que a ligação de Ca^{2+} a partículas submitocondriais, provavelmente a cardiolipina (o único lipídeo aniônico presente na mitocôndria), causa alterações na organização dos lipídeos (empacotamento) e separação de fase, condições que comprometem a conformação e, conseqüentemente, a funcionalidade de proteínas/enzimas da membrana. Nestas condições, a produção de radicais livres pelo sistema transportador de elétrons pode ser aumentada. Isto está de acordo com o aumento na produção de H_2O_2 por mitocôndrias na presença de Ca^{2+} (GRIJALBA *et al*, 1999; CASTILHO *et al*, 1995A).

1.5. Transição de Permeabilidade da Membrana Mitocondrial Induzida em Condições de Estresse Oxidativo

O efluxo de Ca^{2+} de mitocôndrias isoladas é estimulado pela presença de nucleotídeos de piridina acetoacetato ou oxaloacetato, ou, quando esses nucleotídeos são oxidados pela cadeia respiratória, na ausência do inibidor de respiração rotenona (LEHNINGER *et al*, 1978; VERCESI *et al*, 1978; COELHO & VERCESI, 1980). Estas condições experimentais podem induzir uma situação de estresse oxidativo *in vitro*, por exaustão de GSH e NADPH mitocondriais (LOTSCHER *et al*, 1979; BEATRICE *et al*, 1984; VERCESI, 1993), substratos das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e glutathione reductase, respectivamente, favorecendo o acúmulo de H_2O_2 . Estudos posteriores utilizando estes e outros prooxidantes (diamida e *t*-butil hidroperóxido) (CASTILHO *et al*, 1995B; BERNARDES *et al*, 1986; VALLE *et al*, 1993) demonstraram que este efluxo de Ca^{2+} era devido a TPM.

Dados da literatura mostram que a TPM também pode ser induzida por sistemas geradores de espécies reativas de oxigênio (ZORATTI & SZABÒ, 1995), tais como menadiona (PETRONILLI *et al*, 1994), nitrofurantoina (CARBONERA *et al*, 1988), ácido 5-amino levulínico (HERMES-LIMA *et al*, 1991; VERCESI *et al*, 1994A) e xantina/xantina oxidase (INOUE *et al*, 1993; TAKEYAMA *et al*, 1993), na presença de Ca^{2+} . A similaridade entre as alterações na membrana mitocondrial causadas por sistemas geradores de espécies reativas de oxigênio e outros indutores da TPM, nos levou a propor que a permeabilização da membrana mitocondrial induzida por Ca^{2+} é uma situação relacionada com o estresse oxidativo mitocondrial. Esta proposta é suportada pelo fato de que o grande acúmulo de Ca^{2+} por mitocôndrias por si só é capaz de aumentar a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio. (CADENAS & BOVERIS, 1980; GRIJALBA *et al*, 1999; CASTILHO *et al*, 1995A).

A participação de espécies reativas de oxigênio geradas pela mitocôndria no mecanismo de permeabilização da membrana mitocondrial por Ca^{2+} foi comprovada por experimentos mostrando que catalase exógena previne a queda

do potencial de membrana e o inchamento mitocondrial causado por Ca^{2+} ou Ca^{2+} e *t*-butil hidroperóxido (CASTILHO *et al*, 1995A; VALLE *et al*, 1993), e por experimentos mostrando que não ocorre permeabilização mitocondrial na ausência de oxigênio molecular ou na presença de *o*-fenantrolina (CASTILHO *et al*, 1995B), um quelante de Fe^{2+} . O Fe^{2+} é necessário para a produção do radical $\text{HO}^{\bullet}$ via Reação de Fenton (SUTTON & WINTERBOURN, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989) e está presente em mitocôndrias de fígado de rato em concentrações aproximadas de 1.7 nmol de Fe/mg de proteína, não incluindo heme proteínas (TANGERAS *et al*, 1980). O Fe^{2+} intramitocondrial pode ser mobilizado por Ca^{2+} (CASTILHO *et al*, 1995B, MERRYFIELD & LARDY, 1982), possivelmente via estimulação da produção de radicais superóxido, que podem promover a mobilização de Fe^{2+} (BIEMOND *et al*, 1984). Este aumento na produção de $\text{HO}^{\bullet}$ favorece a ocorrência da TPM.

Quanto ao sítio de vazamento de elétrons (produção de espécies reativas de oxigênio) na cadeia respiratória, nosso grupo (KOWALTOWSKI *et al*, 1995) mostrou que mitocôndrias são mais sensíveis ao efeito do Ca^{2+} quando energizadas por succinato, que reduz a coenzima Q, em comparação com o uso do substrato do complexo IV, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamina (TMPD)(KOWALTOWSKI *et al*, 1995; CASTILHO *et al*, 1995A). Isto sugere um importante papel das formas reduzida e semiquinona da coenzima Q como redutores univalentes de oxigênio.

Um dos primeiros agentes indutores da TPM descritos foi o fosfato inorgânico (P_i) (GUNTER & PFEIFFER, 1990; ZORATTI & SZABÒ, 1995). Apesar de muitos estudos sobre a TPM induzida por P_i , o mecanismo pelo qual este agente induzia a permeabilização mitocondrial era desconhecido. No entanto, recentemente, nosso grupo demonstrou que (i) P_i aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias carregadas com Ca^{2+} (KOWALTOWSKI *et al*, 1996A, 1996B) e que (ii) a permeabilização induzida por P_i e Ca^{2+} é inibida por catalase ou na ausência de oxigênio (KOWALTOWSKI *et al*, 1996A, 1996B), demonstrando que espécies reativas de oxigênio participam no mecanismo. Na presença de altas concentrações de P_i (≥ 4 mM) a

permeabilização mitocondrial é causada tanto pela TPM quanto por peroxidação lipídica da membrana mitocondrial por catalizar a tautomerização de aldeídos (produtos de peroxidação lipídica) (INDIG *et al*, 1988), favorecendo a oxidação de formas enólicas por hemeproteínas, tal como o citocromo c. Esta oxidação produz espécies no estado triplete (NANTES *et al*, 1995), que aumentam a propagação do processo de peroxidação lipídica (NANTES *et al*, 1995; CADENAS, 1989; DI MASCIO *et al*, 1992). A participação de espécies tripletes é apoiada pelo efeito inibitório do sorbato (KOWALTOWSKI *et al*, 1996A), um sequestrador de carbonilas tripletes (BECHARA *et al*, 1979).

O grupo do Prof. Bernardi tem proposto que a abertura do PTP pode ser inibida pelo alto potencial de membrana, e pode ser induzida pela despolarização da membrana (BERNARDI, 1992; BERNARDI *et al*, 1994, BERNARDI & PETRONILI, 1996). Neste contexto, nosso laboratório demonstra que, ao induzir a despolarização da membrana, um importante aumento na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio é observada, seguida de uma permeabilização da membrana mitocondrial sensível à catalase e à ausência de oxigênio (KOWALTOWSKI *et al*, 1996A). Assim, a despolarização da membrana pode agir de duas maneiras: (i) favorecendo o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que levam a alterações proteicas e geram o PTP, e (ii) aumentando a probabilidade de abertura do PTP. Em 1987, Vercesi (VERCESI, 1987) demonstrou que, em baixos potenciais de membrana, a NAD(P)H transidrogenase não é capaz de manter alto nível de poder redutor (NADPH e GSH) mitocondrial, o que favorece o estresse oxidativo.

A completa inibição da permeabilização mitocondrial induzida por espécies reativas de oxigênio e Ca^{2+} observada na presença de ditioneitol (VALLE *et al*, 1993; VERCESI *et al* 1994A; KOWALTOWSKI *et al*, 1996A), um redutor de dissulfetos, é uma forte evidência de que grupos tióis proteicos são alvos importantes das espécies reativas de oxigênio, geradas pela mitocôndria. Fagian e colaboradores (FAGIAN *et al*, 1990) apresentaram evidências de que o aumento da permeabilidade da membrana de partículas submitocondriais de coração e mitoplastos de fígado incubados na presença de Ca^{2+} e diamida,

estava associado a polimerização proteica devido à ligação cruzada entre tióis. O ataque de tióis proteicos por radicais $\text{HO}^\bullet$ geram agregados proteicos de alto peso molecular devido à formação de ligações cruzadas disulfeto entre proteínas (CASTILHO *et al*, 1995A; VALLE *et al*, 1993; VERCESI *et al*, 1994A). Estas alterações proteicas são acompanhadas por um decréscimo no conteúdo de tióis de proteínas da membrana mitocondrial. (CASTILHO *et al*, 1996). As espécies reativas de oxigênio (principalmente o radical hidroxil) podem promover a oxidação de grupos tióis proteicos inseridos na fase lipídica da membrana mitocondrial, provavelmente perto do sítio de produção destes radicais (KOWALTOWSKI *et al*, 1996B).

Um dos possíveis alvos proteicos para as espécies reativas de oxigênio é o translocador de ADP/ATP, que possui quatro resíduos de cisteína (KLIGENBERG, 1989; MAJIMA *et al*, 1994). A inibição da TPM por ADP, num mecanismo sensível a carboxiatractilosídeo, suporta a participação do translocador de ADP/ATP na permeabilização da membrana. Este translocador é a proteína integral mais abundante na membrana mitocondrial interna e sua interação com vários ligantes (ADP, ATP, bongkreinato, carboxiatractilosídeo) induz a mudanças na conformação deste translocador (conformação *m* ou *c*) (KLIGENBERG, 1989) e modificações estruturais da mitocôndria (SCHERER & KLIGENBERG, 1974). É possível que a ligação de ADP ao translocador proteja contra a oxidação proteica por (i) promover alterações na conformação do translocador de ADP/ATP e por modificar a posição de seus grupos tióis (KLIGENBERG, 1989; MAJIMA *et al*, 1994), deixando-os pouco acessíveis a oxidação por espécies reativas de oxigênio ou por (ii) modificar a conformação mitocondrial de um estado ortodoxo para condensado, uma alteração que pode proteger grupos tióis de outras proteínas contra a oxidação. A segunda hipótese é suportada por resultados de Novgorodov e colaboradores (NOVGORODOV *et al*, 1994), mostrando o envolvimento indireto do translocador de ADP/ATP no mecanismo de abertura do PTP.

Muitos dos indutores da TPM são reagentes formadores de ligações cruzadas entre tióis (*thiol cross-linkers*) (ZORATTI & SZABÒ, 1995). Estes

compostos promovem uma permeabilização mitocondrial Ca^{2+} dependente e sensível à ciclosporina A, mas não à catalase ou anóxia (CASTILHO *et al*, 1995A). Isto sugere que a formação de ligações cruzadas entre tióis de proteínas que levam a TPM pode ser tanto causada por espécies reativas de oxigênio ou diretamente por reagentes formadores de ligações cruzadas entre tióis. A TPM promovida por reagentes tióis é um modelo experimental interessante para o estudo da participação do Ca^{2+} neste processo, esta permeabilização é independente do estímulo na produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio provocado pelo Ca^{2+} . Em nossos estudos, temos dado ênfase à TPM induzida pelo reagente bifuncional hidrofóbico de tióis óxido de fenilarsina (BERNARDI, 1992) e pelo reagente bifuncional hidrofílico de tióis ácido 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfônico (DIDS) (BERNARDES *et al*, 1994), em comparação com a TPM induzida por espécies reativas de oxigênio (na presença de *t*-butil hidroperóxido). Observamos que o reagente tiólico monofuncional hidrofóbico *N*-etilmaleimida inibe a permeabilização mitocondrial induzida por *t*-butil hidroperóxido, DIDS e óxido de fenilarsina, enquanto o reagente tiólico monofuncional hidrofílico mersalil inibe somente o efeito do DIDS (KOWALTOWSKI *et al*, 1997). Estes resultados mostram que diferentes indutores da TPM podem reagir com grupos tióis distintos da membrana mitocondrial.

É importante enfatizar que apesar da TPM ser induzida principalmente pela oxidação de tióis e formação de ligações cruzadas entre proteínas, na presença de espécies reativas de oxigênio outras alterações oxidativas da mitocôndria podem ocorrer, tais como peroxidação lipídica (ver acima) e fragmentação do DNAm (RICHTER *et al*, 1995).

Sabe-se que a queda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) devida à abertura do PTP é revertida por redutores de nucleotídeos de piridina (VERCESI, 1984A), EGTA (VERCESI *et al*, 1994A; CASTILHO *et al*, 1996; CROMPTON *et al*, 1988), ditiotreitól (VALLE *et al*, 1993), ou ciclosporina A na presença de Mg^{2+} ou ADP (NOVGORODOV *et al*, 1994). Nós observamos que se a adição de EGTA for feita após algum tempo (> 10 min) de completa

permeabilização mitocondrial, não ocorre o resselamento da membrana mitocondrial e ocorre um grande decréscimo no conteúdo de tióis de proteínas e aumento da formação de agregados proteicos devido a ligações cruzadas -S-S- (CASTILHO *et al*, 1996). Isto sugere que se a oxidação de proteína de membrana e formação de agregados for extensa, devido a intenso estado de estresse oxidativo, a permeabilização mitocondrial torna-se irreversível. Propusemos que diferentes fases de permeabilização mitocondrial ocorrem. Inicialmente, a ligação -S-S- intrapeptídico resultaria em permeabilidade para pequenos íons e moléculas. O progresso na formação de ligações cruzadas -S-S- deixaria a membrana mitocondrial interna permeável à sacarose. Finalmente, a agregação proteica generalizada, produzindo *clusters* proteicos, poderia causar uma grande e irreversível permeabilização da membrana, permitindo a passagem de até pequenas proteínas.

A permeabilização irreversível da membrana mitocondrial também ocorre na presença de altas concentrações de P_i ($> 4\text{mM}$) devido a ocorrência concomitante de peroxidação de lipídeos da membrana e abertura do PTP (ver discussão acima, KOWALTOWSKI *et al*, 1996A). A peroxidação lipídica é responsável também pela permeabilização mitocondrial inespecífica e irreversível causada por Ca^{2+} na presença de outros oxidantes, tais como Fe^{2+} -citrato (CASTILHO *et al*, 1994) ou Fe^{2+} -ATP (HERMES-LIMA *et al*, 1995).

1.6. Possíveis Ações de Ca^{2+} no Processo de Permeabilização da Membrana Mitocondrial Interna

A presença de Ca^{2+} na matriz mitocondrial é necessária para induzir a TPM (ZORATTI & SZABÒ, 1995). Isto é comprovado pela inibição da permeabilização mitocondrial por vermelho de rutênio, que bloqueia a via de influxo de Ca^{2+} (REED & BYGRAVE, 1974A). De acordo com dados da literatura e de nosso laboratório, o Ca^{2+} pode agir em quatro etapas na indução da TPM: i) estimulando a produção de $\text{O}_2^*/\text{H}_2\text{O}_2$ pela cadeia respiratória (CADENAS & BOVERIS, 1980; CASTILHO *et al*, 1995A); ii) estimulando a Reação de Fenton

através da mobilização de Fe^{2+} da matriz mitocondrial (CASTILHO *et al*, 1995B); iii) expondo grupos tióis de proteínas da membrana, permitindo a TPM na presença de reagentes de tióis hidrofílicos (KOWALTOWSKI *et al*, 1996B); iv) regulando diretamente a abertura do PTP por se ligar a proteínas específicas da membrana mitocondrial (GUNTER & PFEIFFER, 1990; GUNTER *et al*, 1994; ZORATTI & SZABÒ, 1995; BERNARDI *et al*, 1994; VERCESI *et al*, 1994A, KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). A inibição competitiva por dibucaína (VERCESI *et al*, 1988; BERNARDI *et al*, 1993), também sugere que a ligação de Ca^{2+} a lipídeos da membrana mitocondrial seja essencial para a abertura do PTP.

1.7. Ordem Kinetoplastida

Dentro do Sub-reino Protozoa destaca-se um grupo de protozoários de grande importância médica e econômica. São os agentes causais das leishmanioses e tripanossomíases humanas e de diversas tripanossomíases de gado e animais domésticos, além de algumas espécies patogênicas para os vegetais. Este grupo constitui a Ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963), que apresenta protozoários com características peculiares, dentre as quais se destaca a presença do cinetoplasto, uma estrutura típica dos membros desta Ordem, que compreende o DNA mitocondrial (SHAPIRO & ENGLUND, 1995), localizado no interior da única mitocôndria, junto à base do flagelo (VICKERMAN, 1976).

Três famílias são reconhecidas: Bodonidae, constituída de flagelados coprozóicos de vida livre, Cryptobiidae, constituída de parasitos de peixes e invertebrados, e Trypanosomatidae, composta por protozoários parasitas de invertebrados, vertebrados e plantas, com alguns gêneros de grande importância médica e econômica (SCHMIDT & ROBERTS, 1996).

A família Trypanosomatidae é composta por flagelados contendo cinetoplasto relativamente pequeno e compacto, com um único flagelo locomotor, que pode estar livre ou próximo ao corpo celular (VICKERMAN, 1976); neste caso, com o movimento flagelar, esta área da membrana é puxada junto com o flagelo, dando

a impressão de formação de uma membrana ondulante (SCHMIDT & ROBERTS, 1989).

Os membros desta família parasitavam originalmente o trato digestivo de insetos e, possivelmente anelídeos (HOARE, 1972). Muitas espécies ainda apresentam apenas um único hospedeiro (monoxênicas), enquanto outras apresentam, além do hospedeiro invertebrado, um hospedeiro vertebrado (heteroxênicas), mantendo um ciclo silvestre, do qual o homem acabou fazendo parte, à medida que também começou a ocupar este ambiente.

Os tripanossomatídeos passam por diversas transformações morfológicas durante seus ciclos evolutivos. Visto que as diferenças com relação ao hospedeiro utilizado, ciclo evolutivo e importância médica e econômica eram consideráveis, impedindo seu uso como critério para separação dos gêneros, a definição de estágios evolutivos adotados durante o ciclo de vida desses parasitos permitiu a classificação dos mesmos nos diferentes gêneros. Atualmente, 9 gêneros são reconhecidos (MARQUARDT & DEMAREE, 1985): *Leptomonas*, *Proleptomonas*, *Crithidia* e *Blastocrithidia* compreendem parasitos monoxêmicos de invertebrados. *Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma* compreendem parasitos heteroxêmicos de invertebrados e vertebrados, sendo os dois últimos gêneros de grande importância médica e econômica. Os gêneros *Phytomonas* e *Herpetomonas* apresentam parasitos heteroxêmicos de invertebrados e plantas, também de grande importância econômica, sendo que este último apresenta algumas espécies que são monoxênicas, infectando apenas invertebrados (MCGHEE & COSGROVE, 1980).

Os estágios evolutivos, apresentados na Figura 3, são definidos de acordo com a ausência ou presença de flagelo visível por microscopia ótica e da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE & WALLACE, 1966).

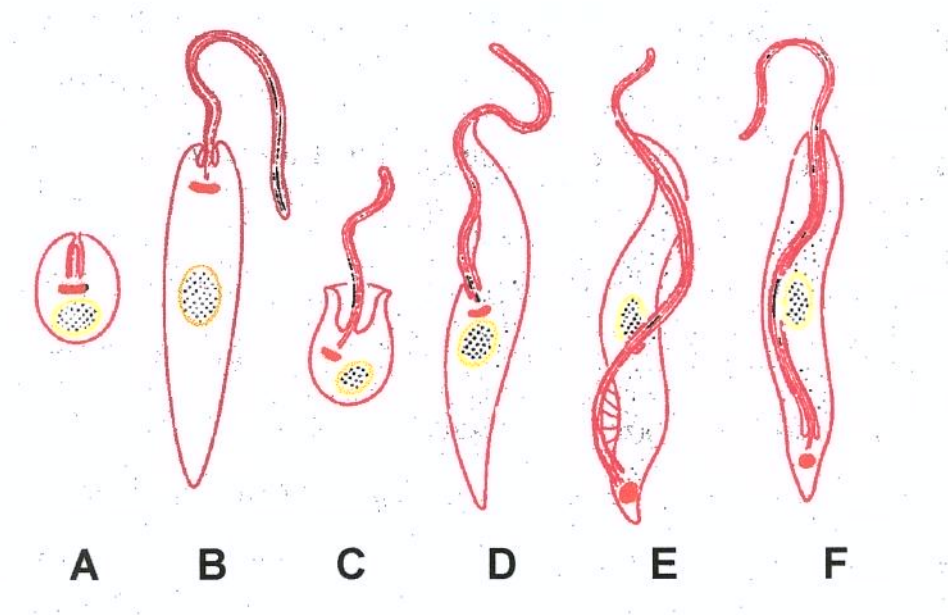


Fig. 3 – Principais formas evolutivas da família Trypanosomatidae. A, Amastigota; B, Promastigota; C, Coanomastigota; D, Epimastigota; E, Tripomastigota; F, Opistomastigota (REY, 1991).

A forma Amastigota (Fig. 3A) apresenta o corpo arredondado e um flagelo curto, visível apenas por microscopia eletrônica. Essa forma ocorre durante o ciclo evolutivo de praticamente todos os gêneros reconhecidos. Na forma Promastigota (Fig. 3B), encontrada nos gêneros *Leishmania*, *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Proleptomonas*, o corpo celular é alongado e o flagelo emerge da região anterior ao núcleo, onde está localizado o cinetoplasto. A forma Coanomastigota (Fig. 3C) é típica do gênero *Crithidia*. O flagelo emerge da região anterior ao núcleo, próximo ao qual está localizado o cinetoplasto. A principal característica desta forma está na região posterior arredondada e uma região anterior alongada, como que formando um tubo por onde emerge o flagelo. Na forma Epimastigota (Fig. 3D), encontrada nos gêneros *Trypanosoma*

e *Blastocrithidia*, o cinetoplasto está localizado próximo ao núcleo e o flagelo emerge lateralmente ao corpo celular formando uma curta “membrana ondulante”. Na forma Tripomastigota (Fig. 3E), característica das formas sanguíneas (hospedeiro vertebrado) e metacíclicas (hospedeiro invertebrado) do gênero *Trypanosoma*, o cinetoplasto está localizado na região posterior ao núcleo de onde emerge o flagelo, próximo à superfície celular, formando uma “membrana ondulante”. Formas Opistomastigotas (Fig. 3F) são encontradas apenas no gênero *Herpetomonas*. O cinetoplasto está localizado na região posterior ao núcleo, de onde emerge o flagelo, passando por dentro do corpo da célula, emergindo apenas na região anterior (SCHMIDT & ROBERTS, 1996).

1.8. Gênero *Trypanosoma*

Os membros do gênero *Trypanosoma* parasitam todas as classes de vertebrados: peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. A grande maioria vive no sangue e outros fluidos corporais do hospedeiro, mas algumas espécies, como *Trypanosoma cruzi*, podem invadir e se replicar no interior de células. Em alguns casos, a infecção não necessariamente gera doença; vários fatores, dentre eles a susceptibilidade do hospedeiro e a patogenicidade do parasito, são importantes para sua evolução (MARQUARDT & DEMAREE, 1985).

De acordo com seu desenvolvimento no inseto vetor, o gênero *Trypanosoma* foi dividido em dois grupos ou seções (HOARE, 1966). Quando uma espécie se desenvolve na porção anterior do trato digestivo do inseto, o parasito é classificado dentro da seção Salivária. A transmissão ocorre por inoculação de formas infectivas durante o repasto sanguíneo. Quando o desenvolvimento ocorre na porção terminal do trato digestivo do inseto, região posterior, o parasito é classificado dentro da seção Estercorária. A transmissão ocorre por contaminação fecal; o vetor elimina as fezes, contendo formas infectivas, no local da picada, durante o repasto sanguíneo. Outros critérios, tais como características morfológicas e biológicas, foram utilizados para enquadrar espécies que não necessitam de um hospedeiro intermediário para propagação

da doença, como *T. equiperdum*, nesta classificação (UKOLI, 1984; CONNOR, 1994).

Das espécies que fazem parte da seção Estercorária, apenas *T. cruzi* tem importância médica, por ser o agente etiológico da doença de Chagas; as demais espécies não são consideradas patogênicas. Em contraste, praticamente todas as espécies de tripanossomas que causam doença em humanos e animais pertencem à seção Salivaria.

As tripanossomíases são doenças de humanos e animais domésticos resultantes da infecção por protozoários parasitas do gênero *Trypanosoma*. Dois tipos de tripanossomíase humana são conhecidas. A tripanossomíase americana ou doença de Chagas ocorre nas Américas Central e Sul, sendo transmitida por insetos hematófagos da família Reduviidae por contaminação fecal, após a picada. O segundo tipo, a tripanossomíase africana ou doença do sono, ocorre na África e é transmitida por moscas hematófagas do gênero *Glossina*, também conhecidas como moscas tsé-tsé, que inoculam as formas infectivas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (CONNOR, 1994). A Tabela I resume as espécies de tripanossomas africanos e as doenças por eles causadas.

Várias espécies de tripanossomas transmitidos pela mosca tsé-tsé são responsáveis pela doença em animais, conhecida como nagana. Entretanto, no caso das tripanossomíases em animais, existem exceções em que algumas espécies são transmitidas por outras moscas que não tsé-tsé ou até mesmo mecanicamente (contato sexual) (CONNOR, 1994).

As tripanossomíases africanas são consideradas doenças de grande importância médica e econômica pelo grande impacto que tiveram, e ainda têm, no desenvolvimento do continente africano. Sua epidemiologia depende quase que inteiramente da distribuição das moscas tsé-tsé. As áreas infestadas se estendem por toda a África tropical e a parte sul do deserto de Saara. Nas áreas onde nagana é endêmica, não se faz possível a criação de animais. O trabalho rural tem que ser realizado manualmente e a população, principalmente crianças, tem alto comprometimento nutricional, já que não pode utilizar produtos

derivados de animais, ricos em proteínas, tais como leite, carne e fibras, na sua dieta (CONNOR, 1994).

Tabela I – Espécies de tripanossomas africanos, seus hospedeiros vertebrados e doenças por eles causadas.

Tripanossoma	Doença	Hospedeiro Vertebrado
<i>T. brucei gambiense</i>	Doença do sono (forma crônica)	Homem
<i>T. brucei rhodesiense</i>	Doença do sono (forma aguda)	Homem, bovinos, antílopes
<i>T. brucei brucei</i>	Nagana	Animais domést., antílopes
<i>T. congolense</i>	Nagana	Ruminantes, porcos, cachorros, equinos
<i>T. simiae</i>	Doença aguda ou crônica	Macacos, porcos, bovinos, equinos, camelos
<i>T. uniforme</i>	Febre recorrente	Ruminantes
<i>T. evansi</i>	Surra	Ruminantes, equinos, cachorros, macacos, elefantes, etc
<i>T. equiperdum</i>	Durina	Equinos

Alguns autores consideram a espécie *T. brucei* responsável pela doença do sono, em humanos, e nagana, no gado. Apesar dos parasitos causadores das duas doenças serem morfologicamente idênticos, as diferenças quanto à infectividade e grau de patogenicidade em diferentes hospedeiros reforçou a separação da espécie em subespécies. Desta forma, *T. brucei brucei* parasita antílopes e animais domésticos, causando a doença conhecida como nagana; porém, não infecta o homem. *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* são as subespécies causadoras da doença do sono em humanos; porém, também são capazes de infectar animais silvestres, que podem servir de reservatórios

naturais para a propagação da doença. Mesmo com a separação da espécie *T. brucei* nas três subespécies mencionadas, a relação entre as mesmas ainda gera muitas controvérsias. Por conveniência, optou-se por agrupá-las no complexo brucei-gambiense-rhodesiense (UKOLI, 1984).

No sangue do hospedeiro mamífero, três formas morfológicas do parasito podem ser reconhecidas, um fenômeno conhecido como pleomorfismo. Eles variam de formas tripomastigotas longas e delgadas, com flagelo livre a formas menos alongadas, sem flagelo livre; passando por formas intermediárias longas e de flagelo curto (Fig. 4). Essas três formas podem ser ingeridas pela mosca tsé-tsé durante o repasto sanguíneo, mas apenas a mais adaptada para sobreviver no inseto vetor consegue se multiplicar na seção posterior do intestino médio, sob a forma tripomastigota, um processo que leva aproximadamente 10 dias. Após esse tempo, essas formas migram para a região anterior do tubo digestivo. Quando chegam às glândulas salivares, as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas, que começam a se multiplicar. Aproximadamente 20 dias após a infecção, os epimastigotas começam a se transformar em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. A mosca infectada pode transmitir a doença para hospedeiros vertebrados, fechando o ciclo (Fig. 4).

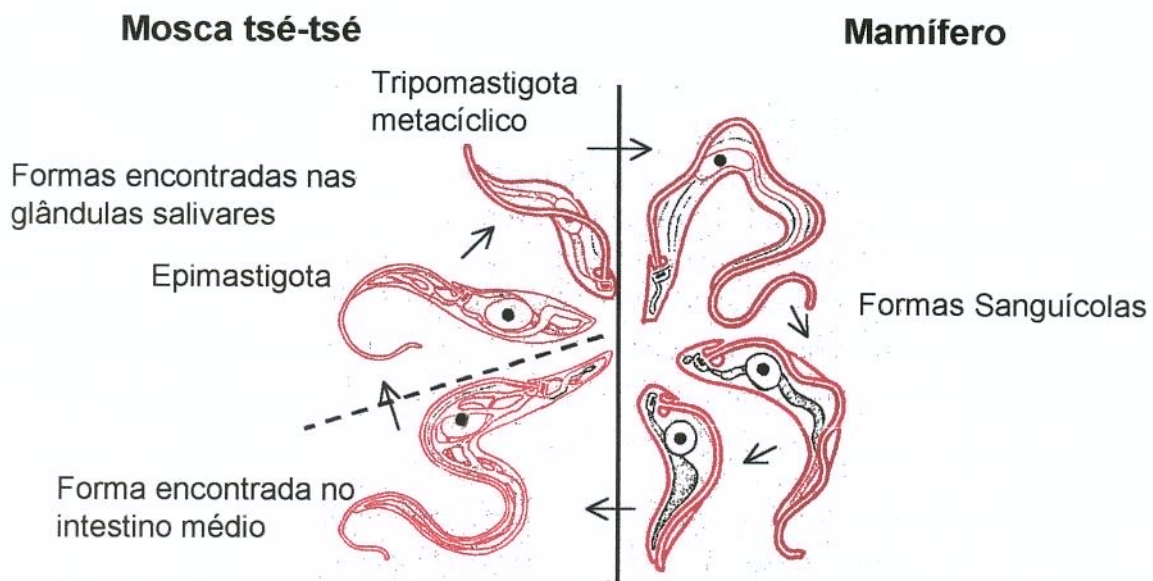


Fig. 4 – Ciclo evolutivo de *Trypanosoma brucei* (VICKERMAN, 1969)

No hospedeiro vertebrado, os tripanossomas se multiplicam no sangue e na linfa. Não invadem células, mas habitam os espaços intercelulares entre tecidos de vários órgãos, principalmente o cérebro. A patologia da doença está baseada na resposta imunológica do hospedeiro. Em animais, a doença é aguda; o hospedeiro sobrevive em média 15 dias, podendo, em alguns casos, durar por alguns meses. Com o curso da infecção, os animais ficam com o corpo edemaciado, perdem a coordenação motora e ficam paralisados, morrendo logo em seguida. Nas infecções humanas por *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*, uma reação no local da picada pode ser observada, desaparecendo em 1-2 semanas. Quando os parasitos atingem o sangue e os canais linfáticos, se reproduzem rapidamente, produzindo parasitemia e invadindo todos os órgãos do corpo. No caso de *T. brucei gambiense*, existe um certo tropismo pelo sistema nervoso. Os linfonodos se tornam maiores e ocorrem períodos de febre intermitente acompanhados de elevada parasitemia. A infecção por *T. brucei rhodesiense* é do tipo agudo; causa rápida perda de peso e envolvimento cardíaco. A morte ocorre poucos meses após a infecção, antes do comprometimento cerebral. Na doença provocada por *T. brucei gambiense*, o parasito invade o sistema nervoso central iniciando uma fase crônica. O hospedeiro desenvolve uma série de sintomas (aumento da apatia, falta de disposição, problemas mentais e de coordenação, convulsões, paralisia, aumento do sono) que acabam levando-o ao coma, seguido de morte (BALES & HARRISON, 1994).

Os mecanismos da patogênese não são muito claros. Evidências sugerem a capacidade do parasito de escapar do sistema imune do hospedeiro. O parasito consegue sobreviver porque é capaz de variar o tipo antigênico de suas proteínas de superfície (variação antigênica). O sistema imune do hospedeiro gera anticorpos para um certo tipo de proteína, encontra condições favoráveis à sua proliferação, resultando em curvas de parasitemia no decorrer da doença (UKOLI, 1984; BALES & HARRISON, 1994; CONNOR, 1994).

1.9. Gênero *Leishmania*

Protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos de uma variedade de doenças distribuídas pelo Velho e Novo Mundos denominadas leishmanioses. Essas doenças, apesar de serem causadas por espécies morfológicamente idênticas, diferem profundamente quanto a seus aspectos clínicos. Os vários tipos clínicos são causados por diferentes espécies de *Leishmania*, agrupadas em complexos bioquímica e enzimaticamente distintos, apresentados na Tabela II. Entretanto, apesar de aceita, esta classificação é bastante arbitrária, tendo em vista o fato de que ainda não há um método padrão para a identificação de espécies.

Segundo a distribuição apresentada na Tabela II, as leishmanioses foram agrupadas em três tipos básicos, com algumas variações. Na forma cutânea, a infecção se localiza na pele, como uma única ou múltiplas lesões, que podem durar de pouco a longo tempo, mas que geralmente têm cura espontânea. Na forma mucosa, a infecção envolve as junções mucocutâneas do nariz e da boca, causando uma destruição tecidual irreversível, que pode atingir o palato e a cavidade faríngea. A forma visceral, também conhecida como kala azar, se caracteriza por uma infecção generalizada do sistema linforeticlar, causando anemia, hepatoesplenomegalia e infecção linfática (MANSON-BAHR, 1994; BERMAN, 1997).

Como tripanossomas, as leishmanias são parasitas heteroxênicos, mantendo uma parte do seu ciclo no tubo digestivo do inseto vetor, onde assumem a forma promastigota, e outra parte no hospedeiro vertebrado, onde são encontradas apenas sob a forma amastigota (Fig. 3) (SCHMIDT & ROBERTS, 1996). Com algumas exceções, as leishmanioses são normalmente consideradas zoonoses, apresentando transmissão entre vetor e hospedeiro vertebrado no ambiente silvestre ou peridomiciliar. O homem é um hospedeiro acidental, sendo infectado quando entra em contato com o ciclo silvestre (MAGILL, 1995).

Tabela II – Distribuição geográfica e manifestações clínicas causadas por diferentes espécies de *Leishmania*.

Subgêneros	Complexos	Espécies	Local	Manifestações Clínicas
<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	Velho Mundo	Visceral
		<i>L. infantum</i>	Velho Mundo	Visceral
		<i>L. chagasi</i>	Novo Mundo	Visceral
	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>	Velho Mundo	Cutânea
	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	Velho Mundo	Cutânea
	<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>	Velho Mundo	Cut. difusa
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	Novo Mundo	Cutânea
		<i>L. venezuelensis</i>	Novo Mundo	Cutânea
		<i>L. amazonensis</i>	Novo Mundo	Cutânea
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Novo Mundo	Cut. difusa
		<i>L. peruviana</i>	Novo Mundo	Cutânea
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	Novo Mundo	Cutânea
		<i>L. panamensis</i>	Novo Mundo	Cutânea

Os hospedeiros intermediários e vetores das leishmanioses são os mosquitos hematófagos da família Psychodidae. Esta família é dividida em 5 gêneros, dentre os quais os mais importantes na epidemiologia das doenças são *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (MAGILL, 1995). Ao sugar o sangue de um animal infectado, o inseto vetor ingere formas amastigotas do parasito que, ao alcançarem o intestino médio ou posterior, se transformam em formas promastigotas. Estas aderem ao epitélio intestinal e começam a se multiplicar por divisão binária. Após a multiplicação, algumas formas promastigotas se diferenciam de uma forma não-infectiva para uma

forma virulenta denominada metacíclica e migram para o esôfago e faringe, bloqueando os mesmos. Quando o vetor tenta se alimentar novamente, regurgita no local da picada para tentar desbloquear o esôfago e conseguir se alimentar, inoculando as formas promastigotas no hospedeiro vertebrado. Uma vez no hospedeiro vertebrado, essas formas invadem as células do sistema retículo endotelial (Fig. 5) (BRAY, 1974; MAGILL, 1995; SCHMIDT & ROBERTS, 1996).

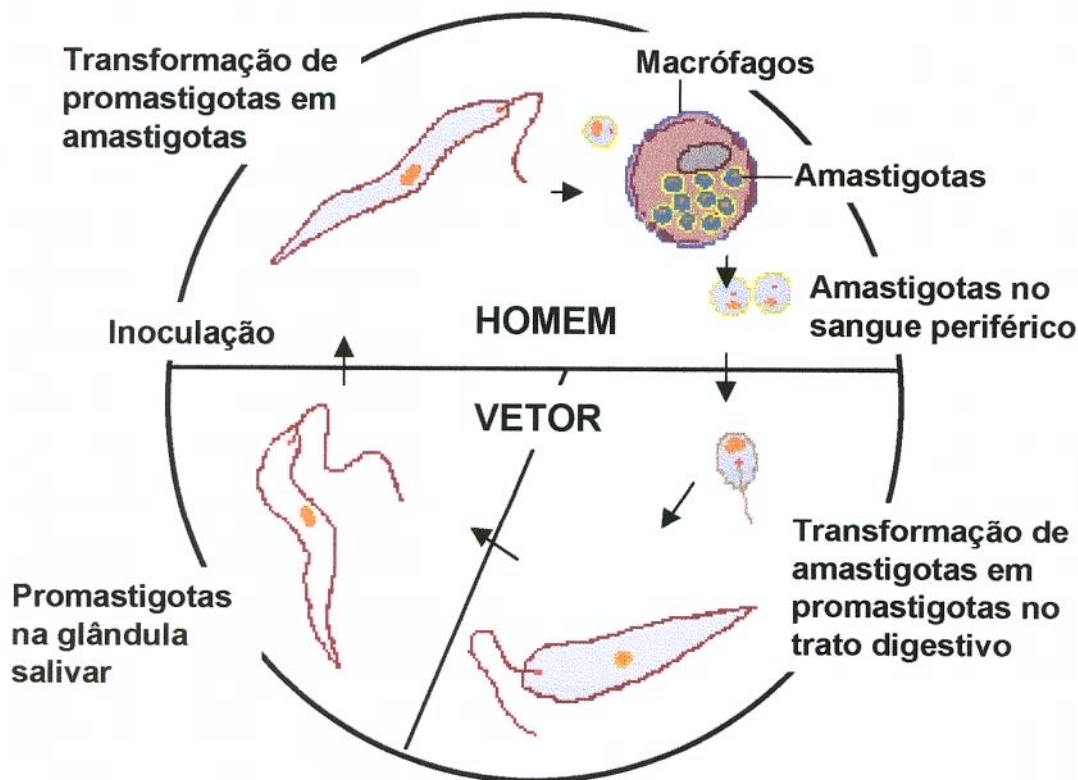


Fig. 5 – Diagrama do ciclo evolutivo de *Leishmania* sp (BRAY, 1974)

O complexo *Leishmania donovani* inclui subespécies responsáveis pela leishmaniose visceral ou kala azar. A doença é causada por *L. donovani* e *L. infantum*, no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo. Apesar das diferenças epidemiológicas, os aspectos clínicos da doença são basicamente os mesmos. Na kala azar clássica, a infecção pode passar inicialmente despercebida e evoluir por um período que pode variar de dias, meses ou anos. O paciente

apresenta febre, fraqueza e perda de peso. Nos casos mais avançados, por uma infecção generalizada do sistema fagocítico mononuclear, o fígado e baço aumentam e tamanho, edema e ascite podem ser observados. Nos casos não tratados, a morte se dá por infecções secundárias, tais como pneumonia, tuberculose ou disenteria (MAGILL, 1995; BERMAN, 1997).

Outras três formas clínicas de leishmaniose visceral têm sido descritas e vêm ganhando mais atenção nos últimos tempos. Uma forma branda que não progride para a kala azar clássica é a forma mais frequente da doença em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Os pacientes em geral se queixam de febre, cansaço, diarreia e dores abdominais. Muitas vezes não ocorre organomegalia (BERMAN, 1997). A doença também vem ganhando espaço como infecção oportunista associada à AIDS, principalmente na região do Mediterrâneo, sendo reconhecida como uma complicação decorrente da imunossupressão (BERMAN, 1997). Em outra forma clínica, reconhecida no Sudão (leishmaniose cutânea pos-kala azar), onde a leishmaniose visceral é endêmica, foi observada, em metade dos casos, a ocorrência de lesões na pele que não regredem espontaneamente e se tornam mais densas até se espalharem por todo o corpo. Esse tipo de evolução parece ser decorrente de uma infecção visceral que não recebeu tratamento adequado (BERMAN, 1997).

1.10. Tratamento e Prevenção de Doenças Parasitárias

Grande número de pessoas e animais apresentam infecções parasitárias e algumas delas aumentam em número de casos a uma taxa alarmante, gerando alta mortalidade e problemas de ordem econômica e social em todo o mundo. Apesar de ser reconhecida a importância do sistema imune do hospedeiro no combate dessas doenças, a possibilidade de desenvolvimento de vacinas eficazes, capazes de preveni-las no homem e animais, se mostra bastante remota, vistos os mecanismos de escape dos nossos sistemas de defesa apresentados por esses parasitos (BALES & HARRISON, 1994; GRIMALDI & MCMAHON-PRATT, 1991). Desta forma, a prevenção dessas doenças depende,

principalmente, de medidas profiláticas e controle de vetores, e em menor escala, do uso de drogas antiparasitárias. Entretanto, a importância da quimioterapia não deve ser diminuída, visto que nem sempre as medidas profiláticas funcionam e que, uma vez adquirida a doença, a única forma de tratamento baseia-se no uso de quimioterapia específica.

É evidente que as drogas até então utilizadas no tratamento de doenças parasitárias não são satisfatórias, seja por sua baixa eficácia, alta toxicidade e/ou desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte do parasito. Isto torna cada vez mais necessário o estudo dos processos biológicos que ocorram nesses organismos, visando encontrar diferenças que possam futuramente ser utilizadas no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, para o combate a essas doenças.

1.11. Biossíntese e Metabolismo de Ácidos Graxos

Como o corpo humano constroa e renova suas estruturas, transforma e guarda energia, e mantém suas várias funções, existem numerosas circunstâncias nas quais se torna essencial o uso de moléculas ou parte de moléculas que não se associam com a água. As propriedades de hidrofobicidade e apolaridade são amplamente supridas por substâncias classificadas como lipídeos. A maioria dos lipídeos são moléculas que contêm, ou são derivadas, de ácidos graxos (FA), e possuem, pelo menos, dois importantes papéis: 1º) são a principal forma de estoque de energia, através da oxidação de FA, que se encontram na forma de triglicérides; 2º) são os maiores constituintes das membranas celulares. Outras funções de grande importância funcional são os lipídeos especializados, que servem como pigmentos (retinal), cofatores (vitamina K), detergentes (sais da bile), transportadores (dolicois), hormônios (derivados da vitamina D, hormônios sexuais), mensageiros intra e extracelulares (eicosanóides e derivados de fosfatidilinositol). A interação de alguns processos envolvidos no metabolismo de lipídeos está mostrada na Figura 6. Em mamíferos, a complexa síntese de ácidos graxos ocorre no citosol.

Essa localização separa processos sintéticos de reações degradativas, muitas das quais ocorrem dentro da matriz mitocondrial.

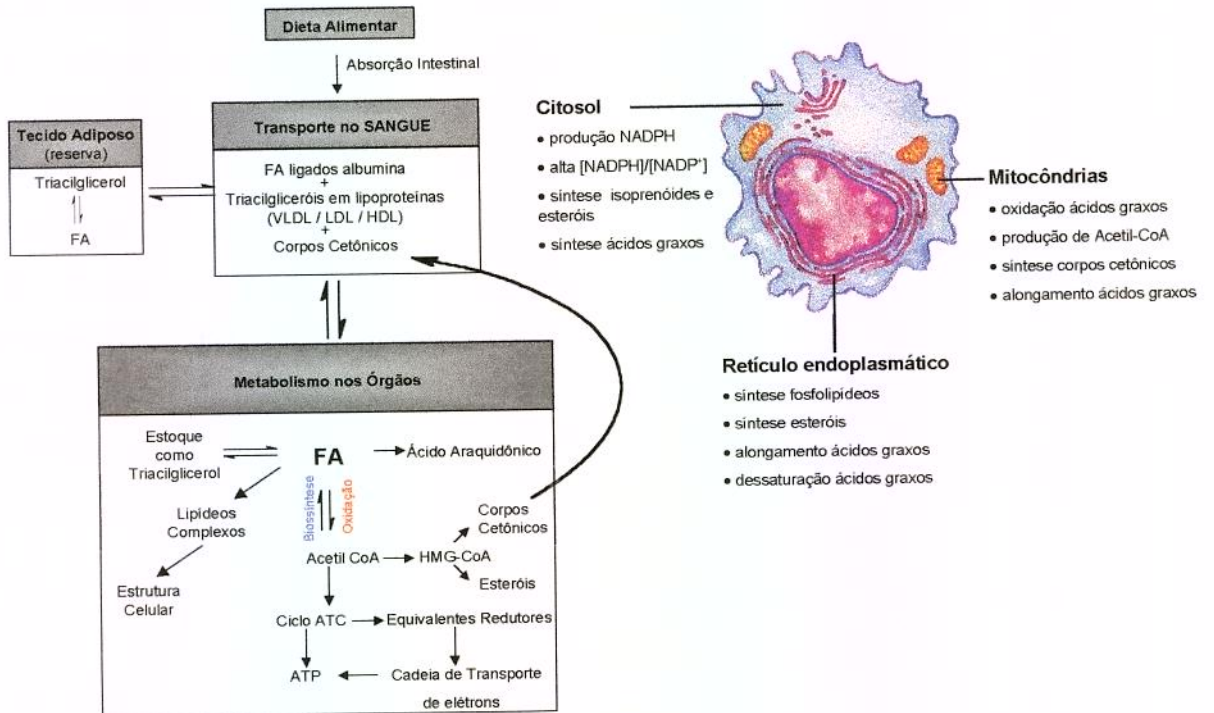


Fig. 6 - Interação metabólica de ácidos graxos no corpo humano. Localização subcelular do metabolismo de lipídeos em células de animais vertebrados e em leveduras.

1.12. Ácido Araquidônico

Eicosanóides são derivados de ácidos graxos, conhecidos como autacóides. São compostos extremamente potentes, que atuam como hormônios, em vários tecidos dos animais vertebrados. Como hormônios, eles não são transportados aos tecidos pelo sangue, mas agem no tecido em que foram produzidos. Esta família de compostos é conhecida por estar envolvida na função reprodutiva, na inflamação, febre, e dor associada à injúria ou doença; na coagulação sanguínea (fatores de agregação plaquetária) e na regulação da pressão sanguínea; na secreção gástrica; e numa variedade de outros

processos importantes para a manutenção da saúde ou da doença, em humanos. Os eicosanóides (em grego, *eikosi* significa “vinte”) são todos derivados do ácido araquidônico (ácido graxo polinsaturado, com 20 átomos de carbono, 20:4). A biossíntese desses compostos ocorre em resposta a sinais hormonais, que interagem com receptores da membrana plasmática, que estão acoplados às proteínas regulatórias ligadas à proteína G. Isto resulta ou em ativação direta de fosfolipases (C, D e/ou A_2) ou na elevação da concentração citosólica de cálcio, que também pode ativar essas enzimas (SMITH, 1992). A Figura 7 mostra a hidrólise dos fosfolipídeos de membrana e alguns dos derivados eicosanóides do ácido araquidônico. Acredita-se que estímulos físicos causem perturbação na membrana celular e aumentam o influxo de cálcio, ativando a fosfolipase A_2 . A fosfolipase A_2 hidroliza a ligação éster dos fosfolipídeos de membrana (particularmente, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) liberando o ácido araquidônico (araquidonato, em pH 7). Por outro lado, a fosfolipase C cliva a ligação fosfodiéster, resultando na formação de 1,2-diacilglicerol. Araquidonato é então liberado do diacilglicerol pela ação sequencial das enzimas lipases neutras: diacilglicerol lipase e monoacilglicerol lipase (OKAZAKI *et al*, 1981). A fosfolipase D pode clivar o fosfolipídeo da membrana liberando ácido fosfatídico, que sob ação da enzima fosfo-hidrolase fosfatidato, resulta na formação de 1,2-diacilglicerol, que, seguindo os mesmos passos citados anteriormente, libera o araquidonato. Uma vez liberado, o araquinonato é metabolizado rapidamente a produtos oxigenados, por sistemas enzimáticos distintos: pela ação de lipoxigenases, há a formação de leucotrienos; pela ação da ciclooxigenase, duas outras classes de substâncias, as prostaglandinas e as tromboxanas. Todas as prostaglandinas contêm anel com 5 átomos de carbono, originário de parte da cadeia do ácido araquidônico. Elas derivam sua nomenclatura através do nome do tecido pelo qual foram primeiramente reconhecidas (próstata). São conhecidas por agir em muitos tecidos, por regular a síntese do mensageiro intracelular, a molécula 3',5'-AMP cíclico (cAMP). Como cAMP media a ação de muitos hormônios, as prostaglandinas afetam muitas funções celulares e dos tecidos. Elevam a

temperatura corporal (produzindo febre) e causam inflamação, resultando na dor. As tromboxanas foram primeiramente isoladas de plaquetas do sangue (também conhecidas como trombócitos), possuem anel com 6 átomos de carbono contendo um éter. São produzidas por plaquetas e atuam na formação de coágulos sanguíneos e na redução do fluxo do sangue no local do coágulo. Leucotrienos, encontrados primeiramente em leucócitos, contêm 3 duplas ligações conjugadas. Eles são poderosos sinalizadores biológicos: induzem a contração do músculo de revestimento das vias aéreas do pulmão. A superprodução de leucotrienos causa ataques asmáticos. A forte contração dos músculos lisos do pulmão, que ocorre durante o choque anafilático, é parte da reação alérgica, potencialmente fatal, em indivíduos hipersensíveis a picadas de abelhas, penicilina ou vários outros agentes. Drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINEs), como a aspirina e o ibuprofen, têm como mecanismo de ação, a inibição da enzima ciclooxigenase, que bloqueia a formação de prostaglandinas e tromboxanas. Corticosteróides ou limitação na oferta do íon cálcio inibem a ação da fosfolipase A₂. Drogas como dazoxibem e primagrel atuam inibindo a ação da enzima tromboxana sintase.

Várias evidências indicam que o metabolismo de AA toma um importante papel em carcinogênese (TSUJII & DUBOIS, 1995; SHENG *et al*, 1997; PRESCOTT & WHITE, 1996). A ciclooxigenase 2 (COX-2), enzima que comanda a síntese de prostaglandinas a partir do AA, tem mostrado ser um fator limitante na carcinogênese de cólon. DAINES, que inibem a COX-2, diminuem o risco de câncer de cólon, em populações estudadas (THUN *et al*, 1991). O nível celular de AA não esterificado é um mecanismo geral, pelo qual a apoptose é regulada, e COX-2 promove carcinogênese pela diminuição deste nível (CAO *et al*, 2000). A superexpressão de COX-2 bloqueia a apoptose e paralelamente aumenta a expressão de Bcl2, uma proteína antiapoptótica, que suprime a apoptose induzida por AA, sugerindo que a expressão de Bcl2 é regulada por AA e que a via dependente de Bcl2 toma um papel protetor na apoptose sinalizada por AA (CAO *et al*, 2000). Na fisiologia do cólon, apoptose é um evento normal, que serve para colocar fim no ciclo de vida das células epiteliais intestinais. No

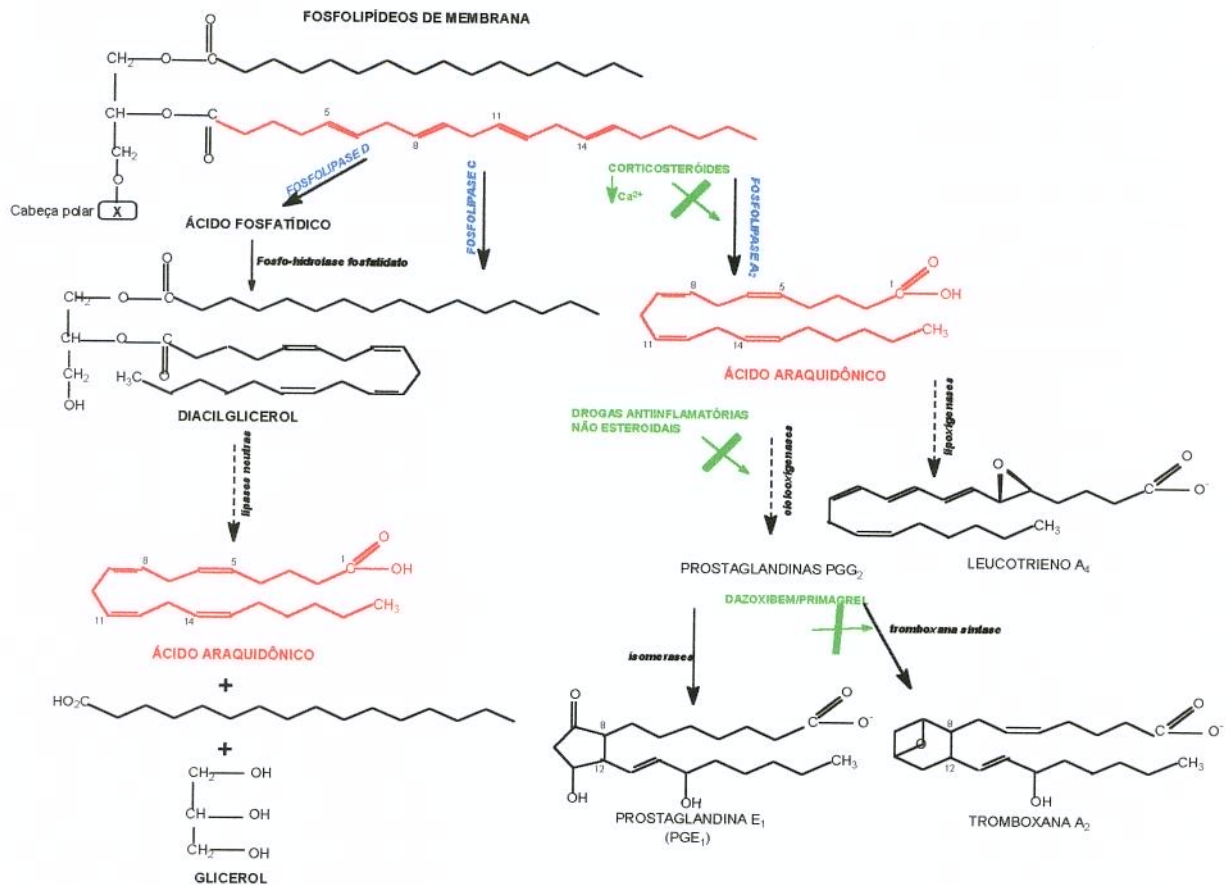


Fig. 7 - Mecanismos de hidrólise de fosfolípidos: ácido araquidônico e alguns de seus derivados eicosanóides.

câncer de cólon, o desvio de AA pelas enzimas, diminuem o AA não esterificado, e promovem o crescimento do tumor por atenuar a apoptose. Outros produtos eicosanóides específicos podem também contribuir para essa transformação, através do aumento da adesão e proliferação celular. No entanto, a inibição da apoptose pela ativação metabólica, que consome AA é o mecanismo vital para promover o crescimento tumoral (CAO *et al*, 2000). Além disso, experimentos mostram que o uso de DAINes é capaz de abolir a parasitemia em

camundongos infectados com *T. cruzi* (estudos *in vivo*) e de bloquear a replicação desses parasitas em culturas de macrófagos (estudos *in vitro*), por suprimir efeitos apoptóticos necessários para o crescimento e replicação desses parasitas (FREIRE-DE-LIMA *et al*, 2000). O desenvolvimento de inibidores específicos e não tóxicos, utilizados como alvo, para as vias metabolizadoras de AA, pode indicar novos enfoques para a intervenção terapêutica, tanto de cânceres quanto em fase aguda de Doença de Chagas.

2. OBJETIVOS

Para uma melhor avaliação do papel de ácido araquidônico na homeostase intracelular de cálcio, lançamos mão de dois modelos experimentais: mitocôndrias isoladas de fígado de rato e tripanossomatídeos, realizando estudos em células intactas e/ou permeabilizadas.

2.1. Efeito de Ácido Araquidônico em Mitocôndrias Isoladas de Fígado de Rato.

Estudamos o envolvimento de ácido araquidônico e cálcio, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, caracterizando o mecanismo de abertura do PTP. Ácidos graxos (FA), em baixas concentrações, podem abrir o PTP através de sua ação protonofórica e pela sua interação direta com o translocador de nucleotídeo de adenina (ANT) (WIECKOWSKI & WOJTCZAK, 1998). Nosso grupo demonstrou que o PTP é formado sob condições de estresse oxidativo (para revisão, KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999), uma condição que pode levar a oxidação de grupos tióis do ANT (VERCESI, 1984). Dado que o PTP pode ter participação na morte celular por necrose ou por apoptose (GREEN & REED, 1998) e o fato de que o AA pode participar como mensageiro secundário em ambos tipos de morte celular (DE VALCK *et al*, 1998), utilizamos este FA para avaliar o mecanismo de abertura de PTP. Para isto, analisamos:

- a) **Parâmetros energéticos mitocondriais:** potencial elétrico de membrana, e velocidade de respiração, no estado 4, induzidos por AA, comparando com os efeitos do clássico protonóforo FCCP.
- b) **Capacidade de abertura do PTP induzida por AA:** i) constatação do PTP, através da utilização dos clássicos inibidores: ciclosporina A, EGTA, ADP; ii) a possível participação do ANT, neste processo; iii) possível efeito

do estado reduzido dos nucleotídeos de piridina; iv) participação das EROs.

- c) **Capacidade de liberação de cálcio:** possível efeito de FA e FCCP, sobre mitocôndrias repletas de cálcio.

2.2. Estudos em Tripanossomatídeos.

Procuramos investigar o possível mecanismo de ação dos ácidos graxos na mobilização intracelular de cálcio utilizando-se de formas tripomastigotas procíclicas de *Trypanosoma brucei*, promastigotas de *Leishmania donovani* e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, tanto em células intactas quanto em células permeabilizadas. Para este estudo, procurou-se verificar:

- a) **Papel da fosfolipase A₂ na homeostase intracelular de Ca²⁺:** o envolvimento desta enzima no influxo de cálcio através da membrana plasmática, uma vez que essa enzima hidroliza fosfolipídeos de membrana, gerando ácido araquidônico endógeno.
- b) **Transporte de cálcio em células intactas:** o efeito da adição de ácido araquidônico e de outros ácidos graxos no transporte de cálcio nesses tripanossomas.
- c) **Transporte de cálcio em células permeabilizadas:** Participação de compartimentos intracelulares, como mitocôndria e acidocalcisomas, *in situ*, em tripanossomas permeabilizados por digitonina, no processo de mobilização de cálcio induzido por FA.
- d) **Possível mecanismo de ação desses ácidos graxos nas membranas plasmática e mitocondriais.**
- e) **Possível papel fisiológico desses ácidos graxos na homeostase de cálcio.**

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes obtidos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, U.S.A.): ATP, melitina, nigericina, ionomicina, succinato, oligomicina, EGTA, HEPES, digitonina, ácido araquidônico, ácido linoleico, ácido linolênico, ácido mirístico, albumina soro bovina (BSA), LaCl_3 , ácido 3-(4-octadecil)-benzoilacrílico (OBAA), antimicina A, arsenazzo III, safranina O, ionóforo de cálcio A_{23187} . Alaranjado de acridina e fura 2/AM foram obtidos de Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.

Soluções

Meio de Reação: Sacarose 125 mM, KCl 65 mM, KH_2PO_4 2 mM, MgCl_2 2 mM, Succinato 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2.

Tampão A: NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, MgSO_4 0,8 mM, glicose 5,5 mM, Hepes 50 mM, pH 7,2.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Culturas de células

Formas tripomastigotas procíclicas de *T. brucei* (variante IL Tar 1) e promastigotas de *L. donovani* (cepa S-2) foram cultivadas a 28°C em meio SDM-79 (BRUN & SCHÖNENBERG, 1979) suplementado com hemina (7,5 mg/l) e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado. Após 2-3 dias de inoculação, células foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes em tampão A e ressuspensas no mesmo tampão. Formas amastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas a partir de cultura em mioblastos L₆E₉, segundo método modificado por Schmatz e Murray (SCHMATZ & MURRAY, 1982) como descrito previamente (DOCAMPO *et al*, 1993). A concentração final de células foi determinada usando-se câmara de Neubauer.

3.2.2. Isolamento de mitocôndrias hepáticas

Mitocôndrias foram isoladas de fígado de ratos adultos Wistar utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo Schneider & Hogeboom (SCHNEIDER & HOGEBOM, 1950), após jejum de 12 hs. O fígado, retirado após a morte do animal por contusão cerebral, foi lavado em solução de sacarose 250 mM contendo tampão HEPES 5,0 mM pH 7,2 e EGTA 0,5 mM. Picado com tesoura e homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem, o material foi centrifugado a 2.500xg por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 10.000xg sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em sacarose 250 mM, HEPES 5,0 mM pH 7,2 e EGTA 0,3 mM, e novamente centrifugado na condição anterior. A fração mitocondrial foi

ressuspensa na mesma solução sendo que isenta de EGTA, numa concentração de aproximadamente 100 mg de proteína por ml.

3.2.3. Dosagem de Proteína

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto (GORNALL *et al*, 1949), modificado pela adição de colato 1% (KAPLAN & PEDERSEN, 1983). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm . A absorbância foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão.

3.2.4. Consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio mitocondrial foi medido utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Yellow Springs Instrument Co.) conectado a oxígrafo Gilson, em uma câmara de vidro de 1,2 ml equipada com agitador magnético. A concentração de oxigênio inicial no meio de reação foi de 225 nmol/ml (ROBINSON & COOPER, 1970).

3.2.5. Transporte de cálcio por mitocôndrias

O movimento de Ca^{2+} através das mitocôndrias foi verificado determinando-se as variações de absorbância do complexo Ca^{2+} -arsenazo III nos comprimentos de onda 675 - 685 nm (SCARPA, 1979). O aparelho utilizado foi um espectrofotômetro SLM Aminco DW2000 com capacidade de determinar as diferenças de absorbância em dois comprimentos de onda em uma mesma

cubeta. O corante arsenazo III apresenta espectros de absorção diferentes na forma livre ou ligada ao Ca^{2+} , conforme caracterizado a seguir. A variação na diferença de absorbância nos comprimentos de onda 675-685 nm está associada a variações na concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação. As calibrações foram feitas determinando-se as variações de absorbância em função de adições de concentrações conhecidas de EGTA, estipuladas considerando-se a concentração de Ca^{2+} livre no meio de reação.

A concentração de Ca^{2+} contaminante no meio de reação foi determinada através de espectrofotometria de absorção atômica (Atomic Absorption Spectrophotometer Perkin Elmer modelo 303). O meio de reação foi composto por 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7,2, 20 μM EGTA, 1 mM K_2HPO_4 , 5 mM succinato, 0,002% de digitonina. A concentração de células utilizadas foi de 5×10^7 cel/ml. Os experimentos foram realizados a 30°C.

3.2.6. Determinação do potencial elétrico ($\Delta\psi$) de membrana mitocondrial

A medida do potencial de membrana mitocondrial foi determinada em células permeabilizadas por digitonina, espectrofotometricamente usando-se o indicador safranina O (5 μM) que apresenta um deslocamento no espectro visível associado a sua ligação à membrana de mitocôndrias energizadas. Esta adsorção é seguida de alteração de espectro de absorbância da safranina na faixa de 500 a 600 nm. Nestas condições as diferenças de absorbância nos comprimentos 511-533 são diretamente proporcionais à amplitude do potencial até valores de aproximadamente 170 mV (ÅKERMAN & WIKSTRÖM, 1976; VERCESI *et al*, 1991A). Estas mudanças de absorbância foram monitoradas em um espectrofotômetro SLM Aminco DW2000. A calibração é feita pela titulação do potencial com a captação de potássio (K^+) na presença de valinomicina, em meio de reação isento de potássio e contendo sacarose 200 mM, HEPES 20 mM pH 7,2, MgCl_2 1 mM, rotenona 4 μM , EGTA 0,3 mM, succinato 5 mM, valinomicina 0,06 $\mu\text{g/ml}$. São realizadas adições sucessivas de KCl, seguidas de

uma adição de nigericina 0,15 µg/ml. Os valores de potencial de membrana são calculados utilizando-se a equação de Nerst, considerando-se a concentração intramitocondrial inicial de K^+ igual a 120 mM. A concentração de células foi de 5×10^7 cel/ml.

3.2.7. Determinação da concentração de cálcio citosólico

A concentração de Ca^{2+} livre intracelular foi determinada em função da fluorescência do fura 2, um indicador específico de Ca^{2+} (PHILOSOPH & ZILBERSTEIN, 1989). O fura 2 apresenta um espectro de excitação característico quando ligado ao íon cálcio. Em sua forma livre, apresenta emissão máxima de fluorescência em 470 nm quando excitada em 380 nm, enquanto que na forma complexada ao Ca^{2+} , a emissão máxima é verificada em 340 nm de excitação. As células foram carregadas com o acetoximetiléster de fura-2 (Fura 2/AM). Após atravessar a membrana plasmática, o éster é hidrolizado por esterases endógenas. O fura-2, que é liberado após a hidrólise, é capaz de se ligar ao Ca^{2+} e pode ser quantificado fluorimetricamente, determinando-se as razões de fluorescência em 470 nm após excitações em 340/380 nm (VERCESI *et al*, 1993B). Após a coleta das células, elas foram lavadas duas vezes a 6000 g por 10 minutos a 4°C em tampão A. As células foram ressuspensas a uma densidade final de 10^9 cel/ml em meio de incubação contendo tampão A acrescido de 6 µM fura 2/AM. A suspensão foi incubada por 30 minutos em banho, sob agitação, a 30°C. Subseqüentemente, as células foram lavadas duas vezes em tampão A, gelado, para remover o fura 2/AM extracelular e ressuspensas no mesmo tampão A, em uma densidade final de 10^9 cel/ml, mantidas em gelo. Para a medida da fluorescência, amostras de 50 µl da suspensão celular foi diluída em 2,5 ml de tampão A (5×10^7 cel/ml, densidade final) em cubeta termostatzada (30°C), em espectrofluorímetro Hitachi F-4010. A excitação foi de 340 e 380 nm e a emissão de 510 nm. A concentração de cálcio intracelular foi calculada como descrito previamente por Grynkiewicz e colaboradores (GRYNKIEWICZ *et al*, 1985), onde a resposta da fluorescência do fura 2/AM para a concentração de cálcio intracelular foi

calibrada a partir da razão entre os valores da fluorescência a 340/380 nm, após subtração do background de fluorescência das células a 340 e a 380 nm.

3.2.8. Determinação do estado redox de NAD(P)

A oxidação ou redução dos nucleotídeos de piridina na suspensão mitocondrial foi acompanhada em espectrofluorímetro Hitachi F-4010 (Hitachi, Ltd., Tokio, Japão) operando em comprimentos de onda de 366 nm para excitação e 450 nm para emissão.

3.2.9. Atividade da bomba de prótons

Acidificação de organelas intracelulares em células permeabilizadas por digitonina foi monitorada pela medida de mudanças no espectro de absorbância de alaranjado de acridina (PALMGREN, 1991), usando o espectrofotômetro SLM Aminco DW2000, nos comprimentos de onda 493/530 nm (VERCESI *et al*, 1992; DOCAMPO *et al*, 1995). O método baseia-se na diferença de absorção de alaranjado de acridina entre as formas monomérica (presente em solução) e dimérica (protonada) (PALMGREN, 1991). Alíquotas da suspensão de células (5×10^7 , densidade final) foram incubadas, sob agitação, a 30°C, em 2,5 ml do meio de reação padrão acrescido de digitonina 20 μ M. Após o período de permeabilização das células (1-2 minutos), foi adicionado alaranjado de acridina 3 μ M e a variação da absorção foi acompanhada.

3.2.10. Métodos Estatísticos

Todos os resultados são representativos de uma série de 3 a 6 experimentos, elaborados em condições idênticas, com diferentes preparações mitocondriais e celulares, e apresentaram uma variação menor do que 10% em sua reprodutibilidade.

4. RESULTADOS

4.1. – 1º Trabalho

ROSANA CATISTI & ANIBAL E. VERCESI. The participation of pyridine nucleotides redox state and reactive oxygen in the mechanism of fatty acids-induced permeability transition in rat liver mitochondria. *FEBS Letters* 464: 97-101, 1999.

4.1.1. Resumo do 1º trabalho

O mecanismo pelo qual ácidos graxos de cadeias longas, em baixas concentrações (5 a 15 μM), induzem a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) em mitocôndrias isoladas, incubadas na presença de cálcio, tem sido explicado tanto pelo seu efeito protonofórico, mediado pelos transportadores aniônicos mitocondriais, quanto pela interação direta na formação do poro (M.R. WIECKOWSKI & L. WOJTCZAK, *FEBS Lett.* **423**: 339-342, 1998). Neste trabalho, comparou-se a capacidade de abertura do PTP, utilizando-se concentrações de ácido araquidônico (AA) e de carbonil cianeto *p*-trifluorometoxifenil-hidrazona (FCCP) capazes de causar, de modo similar, a dissipação do potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi$) em mitocôndrias de fígado de rato, na presença de cálcio e do substrato respiratório succinato. O efeito protonofórico inicial de AA e FCCP foi muito pouco modificado por carboxiatractilósido. A abertura do PTP, indicado pela segunda fase de eliminação do $\Delta\Psi$ mostrou ser sensível a EGTA, ADP, ditiotretol e ciclosporina A. Essa fase, que foi acompanhada pela estimulação do consumo de oxigênio, pode ser também prevenida por rotenona e por substratos respiratórios, que diminuem a oxidação de nucleotídeos de piridina (NP). Estes resultados sugerem que, sob as condições experimentais aqui utilizadas, a abertura do PTP induzido por AA ou FCCP foi consequência da oxidação dos NP. Catalase exógena também inibe a abertura do PTP induzida por AA ou FCCP. Estes

resultados indicam que a condição de estresse oxidativo associada ao estado oxidado dos NP são a base para a oxidação de tióis das proteínas de membrana e a abertura do PTP.

4.1.2. Introdução ao 1º trabalho

Sabe-se há muito tempo que ácidos graxos não esterificados de cadeias longas (FA) desacoplam a fosforilação oxidativa (PRESSMAN & LARDY, 1956). Recentemente Skulachev (SKULACHEV, 1991) propôs um mecanismo de ação, através do ciclo de ácido graxo. De acordo com este modelo (mecanismo flip-flop), que tem sido confirmado por várias linhas de pesquisa (para revisões, veja JEZEK *et al*, 1998; SKULACHEV, 1998), o movimento, através da bicamada fosfolipídica da membrana mitocondrial interna, da forma protonada de FA para a matriz mitocondrial é dirigido passivamente pelo gradiente de pH (ΔpH). O ânion de FA desprotonado é exportado eletroforicamente pelos transportadores aniônicos mitocondriais, tais como: o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) (SKULACHEV, 1991); o canal trocador de aspartato/glutamato (SAMARTSEV *et al*, 1997); o translocador de dicarboxilatos (WIECKOWSLI & WOJTCZAK, 1997); ou por proteínas desacopladoras (SKULACHEV, 1991; JEZEK *et al*, 1998). Em cada volta do ciclo de FA, um próton é deixado no interior da matriz mitocondrial, desacoplando a fosforilação oxidativa. Na presença de cálcio, FA são capazes de abrir o poro de transição de permeabilidade (PTP) (WIECKOWSLI & WOJTCZAK, 1998; CHAVES *et al*, 1999). A abertura do PTP se encontra facilitada na presença de baixo potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi$) (VERCESI, 1987; BERNARDI *et al*, 1994; HALESTRAP *et al*, 1997). Neste caso, FA, em baixas concentrações, podem abrir o PTP através de sua ação protonofórica e pela sua interação direta com o ANT (WIECKOWSLI & WOJTCZAK, 1998), um dos possíveis componentes que participam na montagem do poro (HALESTRAP *et al*, 1997; GREEN & REED, 1998). Uma outra característica do PTP é sua capacidade de formação sob condições de estresse oxidativo (para revisão, veja KOWALTOWSKI &

VERCESI, 1999), uma condição que pode oxidar grupos tióis do ANT (VERCESI, 1984B; HALESTRAP *et al*, 1997). Vercesi (VERCESI, 1987) propôs um elo entre o potencial de membrana mitocondrial e abertura do PTP, através da enzima NAD(P)H transidrogenase, que utiliza o $\Delta\Psi$ para deslocar a reação:



para a direita (HOEK & RYDSTRON, 1988). Esta coenzima é a fonte de equivalentes redutores mitocondriais que suprem o sistema glutathione redutase/glutathione peroxidase para sequestrar a maioria das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela mitocôndria (VERCESI & HOFFMANN, 1993), protegendo assim a organela contra a abertura do PTP (VERCESI, 1984B) e a peroxidação lipídica (KOWALTOWSKI *et al*, 1996A). Em condições de baixo potencial de membrana, este processo antioxidante é prejudicado e a condição de estresse oxidativo pode surgir (VERCESI & HOFFMANN, 1993). Em adição, dados anteriores (LE-QUOC & LE-QUOC, 1989) propuseram que tióis de ANT podem estar oxidados quando o nível de NAD(P)H é baixo, condição que favorece a abertura do PTP (LE-QUOC & LE-QUOC, 1989).

Uma vez que ambos, FA e o protonóforo FCCP, estimulam o consumo de oxigênio e oxidam os componentes da cadeia respiratória, resolvemos examinar a possível participação do estado redox do NAD(P) no mecanismo de abertura do PTP induzidos por AA e FCCP. Dado que o PTP pode ter participação na morte celular por necrose ou por apoptose (GREEN & REED, 1998), e o fato de que AA pode participar como mensageiro secundário em ambos tipos de morte celular (DE VALCK *et al*, 1998), utilizamos este FA para avaliar o mecanismo de abertura do PTP.

4.1.3 1º trabalho: The participation of pyridine nucleotides redox state and reactive oxygen in the mechanism of fatty acids-induced permeability transition in rat liver mitochondria.

The participation of pyridine nucleotides redox state and reactive oxygen in the fatty acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria

Rosana Catisti, Anibal E. Vercesi*

Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Received 12 November 1999

Edited by Vladimir Skulachev

Abstract The ability of low concentrations (5–15 μM) of long-chain fatty acids to open the permeability transition pore (PTP) in Ca^{2+} -loaded mitochondria has been ascribed to their protonophoric effect mediated by mitochondrial anion carriers, as well as to a direct interaction with the pore assembly [M.R. Wieckowski and L. Wojtczak, FEBS Lett. 423 (1998) 339–342]. Here, we have compared the PTP opening ability of arachidonic acid (AA) with that of carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) at concentrations that cause similar quantitative dissipation of the membrane potential ($\Delta\psi$) in Ca^{2+} -loaded rat liver mitochondria respiring on succinate. The initial protonophoric effects of AA and FCCP were only slightly modified by carboxyatractyloside and were followed by PTP opening, as indicated by a second phase of $\Delta\psi$ disruption sensitive to EGTA, ADP, dithiothreitol and cyclosporin A. This second phase of $\Delta\psi$ dissipation could also be prevented by rotenone or NAD(P)H-linked substrates which decrease the pyridine nucleotide (PN) oxidation that follows the stimulation of oxygen consumption induced by AA or FCCP. These results suggest that, under the experimental conditions used here, the PTP opening induced by AA or FCCP was a consequence of PN oxidation. Exogenous catalase also inhibited both AA- and FCCP-induced PTP opening. These results indicate that a condition of oxidative stress associated with the oxidized state of PN underlies membrane protein thiol oxidation and PTP opening.

© 1999 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Arachidonic acid; Mitochondrion; Membrane permeability transition; NAD(P)H; Calcium ion

1. Introduction

Although the ability of non-esterified long-chain fatty acids (FA) to uncouple oxidative phosphorylation has been known for a long time [1], only recently was this mechanism clarified by the concept of the fatty acid cycle put forward by Skulachev [2]. According to this model, which has been confirmed by several independent lines of evidence (for reviews, see

[3,4]), protonated FA movement to the mitochondrial matrix is passively driven by the ΔpH across the phospholipid bilayer of the inner membrane (flip-flop mechanism). The deprotonated FA anion is subsequently exported electrophoretically by mitochondrial anion carriers such as the ATP/ADP antiporter (ANT) [2], the aspartate/glutamate antiporter [5], the dicarboxylate carrier [6] or uncoupling proteins [2,3]. In each round of the FA cycle, one proton is left behind in the matrix. In addition to their ability to specifically uncouple oxidative phosphorylation, FA are also able to open the permeability transition pore (PTP) [7,8] in Ca^{2+} -loaded mitochondria. Since opening of the PTP is facilitated at lower transmembrane potentials ($\Delta\psi$) [9–11], the ability of FA, at low concentrations, to open the PTP has been ascribed to their protonophoric action and to their direct interaction with the ANT [7], a putative component of the pore assembly [11,12]. Another characteristic of the PTP is its ability to open under conditions of oxidative stress (for review, see [13]), a condition that may oxidize thiol groups in the ANT [11,14]. Vercesi [9] proposed a link between the mitochondrial membrane potential and PTP opening through the energy-linked NAD(P)H transhydrogenase which uses the $\Delta\psi$ to displace the redox potential of NADP to a more reduced state [15]. This coenzyme is the source of mitochondrial reducing equivalents that allows glutathione reductase/glutathione peroxidase to scavenge most of the reactive oxygen species (ROS) produced by mitochondria [16], thus protecting the organelle against PTP opening [14] and lipid peroxidation [17]. At low membrane potential, this antioxidant process is impaired and a condition of oxidative stress may arise [16]. In addition, earlier data [18] provided evidence that ANT thiols may be oxidized when the level of NAD(P)H is low, a condition that favors PTP opening [18].

Since both FA and the classical protonophore carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) stimulate oxygen consumption and shift the electron transfer components of the respiratory chain to a more oxidized state, we have examined the possible participation of the NAD(P) redox state in the mechanism of FA- and FCCP-induced PTP opening. Given the possible participation of the PTP in both necrotic and apoptotic cell death [12] and the fact that arachidonic acid (AA) may participate as a secondary messenger in both modes of cell death [19], we have used this FA to assess the mechanism of PTP opening.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of rat liver mitochondria and standard incubation procedure

Rat liver mitochondria (RLM) were isolated by conventional differ-

*Corresponding author. Fax: (55)-9-788 1118.
E-mail: anibal@obelix.unicamp.br

Abbreviations: ANT, adenine nucleotide translocator; AA, arachidonic acid; CyP-D, cyclophilin D; CsA, cyclosporin A; DTT, dithiothreitol; FA, fatty acids; PTP, permeability transition pore; EGTA, ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; FCCP, carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; NAD(P)H, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PN, pyridine nucleotides; RLM, rat liver mitochondria; ROS, reactive oxygen species

ential centrifugation from the livers of adult female Wistar rats fasted overnight. The experiments were carried out at 30°C in a standard medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES (2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid), pH 7.2, 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 and 5 mM succinate. The experiments were done in glass cuvettes with magnetic stirring in a final volume of 2.0 ml and a protein concentration of 0.5 mg ml⁻¹. Other additions are indicated in the figure legends. The results shown are representative or averages of at least three experiments.

2.2. Measurements of mitochondrial transmembrane electrical potential ($\Delta\psi$)

The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) was estimated by measuring the fluorescence changes of safranin O (5 μM) [20], using a model F-4010 Hitachi spectrofluorometer (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) operated at excitation and emission wavelengths of 495 nm and 586 nm, respectively, and a slit width of 5 nm. A calibration curve was obtained when mitochondria were incubated in K^+ -free reaction medium containing 250 mM sucrose, 10 mM Na-HEPES buffer (pH 7.2) and 0.5 mM EGTA. The changes in the fluorescence of safranin induced by mitochondrial energization were similar in the absence or presence of K^+ . In all experiments, one fluorescence unit corresponded to 40 mV.

2.3. Determination of Ca^{2+} movement

Variations in the concentration of free Ca^{2+} were followed by measuring the changes in the absorbance spectrum of arsenazo III [21], using an SLM Aminco DW2000 spectrophotometer set at the wavelength pair 675–685 nm.

2.4. Determination of the NAD(P) redox state

The oxidation or reduction of pyridine nucleotides in the mitochondrial suspension was followed in a Hitachi F-4010 spectrofluorometer (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan) operating at excitation and emission wavelengths of 366 and 450 nm, respectively, with a slit width of 5 nm.

2.5. Oxygen uptake measurements

Oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode (Yellow Springs Instruments, OH, USA) in 1.3 ml of standard reaction medium (30°C), in a sealed glass cuvette equipped with a magnetic stirrer.

2.6. Materials

Safranin O, catalase (C10), cyclosporin A (CsA), HEPES, arsenazo III, rotenone, EGTA, antimycin A, ADP, α -nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form, α -NADH), FCCP, dithiothreitol (DTT), succinate, β -hydroxybutyrate, isocitrate and carboxyatractyloside were from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). All other reagents were of the highest grade available.

3. Results

3.1. Membrane potential alterations induced by AA and FCCP in Ca^{2+} -loaded rat liver mitochondria

Fig. 1 shows that when RLM were added to the standard medium containing 30 μM free Ca^{2+} and 5 mM succinate as substrate, there was a fast decrease in the fluorescence of safranin compatible with the formation of a membrane potential. The addition of 10 μM AA (panel A, line a) or 50 nM FCCP (panel B, line a) caused a biphasic decrease in the membrane potential ($\Delta\psi$). The first phase (about 20 mV) was compatible with a pure protonophoric effect of these compounds and was followed by a larger second phase of membrane depolarization compatible with the mitochondrial permeability transition (MPT). The initial protonophoric effect was partially inhibited, whereas the second phase of the decrease in $\Delta\psi$ was totally prevented by the permeability transition inhibitors ADP (lines c), catalase (lines d), DTT (lines e), EGTA (lines f) and CsA (lines g). Rotenone (lines h) and the NAD(P)H-linked substrates β -hydroxybutyrate plus isocitrate (lines i) had similar effects. Carboxyatractyloside (1.0 μM , lines b) caused only a very small inhibition at pH 7.2, in agreement with a previous report [5]. Lines j represent control experiments without AA or FCCP. The addition of antimycin A at the end of the experiments caused a total collapse of $\Delta\psi$.

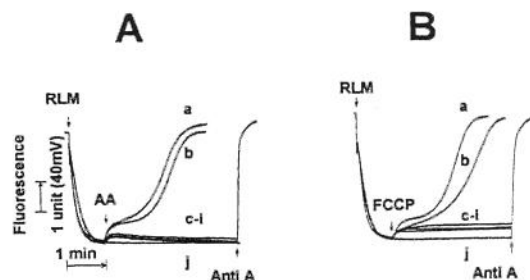


Fig. 1. Mitochondrial membrane potential collapse induced by AA and FCCP: the effects of ADP, catalase, carboxyatractyloside, DTT, EGTA, CsA and rotenone. RLM (0.5 mg ml⁻¹) were incubated in medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.2, 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM sodium succinate, 30 μM CaCl_2 and 5 μM safranin, at 30°C. As indicated, 10 μM AA (panel A, line a) or 50 nM FCCP (panel B, line a) was added in the presence of 1 μM carboxyatractyloside (lines b), 200 nmol ADP and 2 μg oligomycin ml⁻¹ (lines c), 2.0 μM catalase (lines d), 2 mM DTT (lines e), 1 mM EGTA (lines f), 1.0 μM CsA (lines g), 4 μM rotenone (lines h) or 5 mM β -hydroxybutyrate plus 0.1 mM isocitrate (lines i). Lines j represent control experiments without additions. Antimycin A (1 μg ml⁻¹) was added at the end of the experiments.

trate (lines i) had similar effects. Carboxyatractyloside (1.0 μM , lines b) caused only a very small inhibition at pH 7.2, in agreement with a previous report [5]. Lines j represent control experiments without AA or FCCP. The addition of antimycin A at the end of the experiments caused a total collapse of $\Delta\psi$.

3.2. Stimulation of respiration and mitochondrial NAD(P)H oxidation induced by AA and FCCP

Mitochondrial pyridine nucleotides are a source of reducing equivalents for the antioxidant enzyme system glutathione reductase/glutathione peroxidase, which converts H_2O_2 into H_2O , thereby preventing the formation of hydroxyl radicals ($\text{HO}^\bullet$) that attack protein thiols leading to MPT [18]. Fig. 2 compares the changes in NAD(P)H fluorescence when the rate of respiration is stimulated by AA or FCCP in mitochondria oxidizing succinate in the absence of rotenone (Fig. 3). The fluorescence measurements were done in the presence of 1.0 μM CsA to prevent any changes in light scattering caused by the mitochondrial swelling that follows NAD(P)H oxidation in Ca^{2+} -loaded mitochondria [18]. The addition of 10 μM AA (panel A, line a) or 50 nM FCCP (panel B, line a) caused a large, fast decrease in fluorescence, compatible with the oxidation of almost 100% of the mitochondrial NAD(P)H [9]. When RLM were incubated with 4 μM rotenone (lines h) or 5 mM β -hydroxybutyrate and 0.1 mM isocitrate (lines g), the addition of AA or FCCP caused much less NAD(P)H oxidation. Only very low inhibition of NAD(P)H oxidation occurred in the presence of 1.0 μM carboxyatractyloside (lines b), 200 nmol ADP (lines c), 2.0 μM catalase (lines d), 2 mM DTT (lines e) or 1 mM EGTA (lines f). Lines i represent control experiments without AA or FCCP. The rate of respiration (Fig. 3) was slightly faster in the presence of FCCP (151.96 ± 1.45 nmol O_2 min⁻¹ mg protein⁻¹) than in the presence of AA (128.18 ± 2.65 nmol O_2 min⁻¹ mg protein⁻¹). The rate of state 4 respiration in the control experiments (line a) was 22.94 ± 0.35 nmol O_2 min⁻¹ mg protein⁻¹.

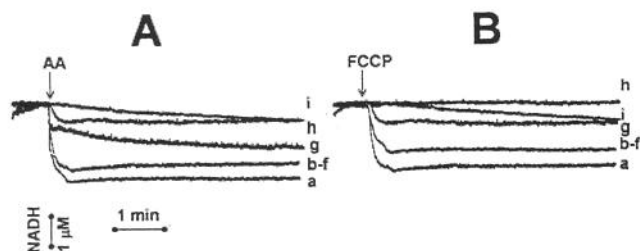


Fig. 2. Mitochondrial NAD(P)H oxidation induced by AA or FCCP. RLM (0.5 mg ml^{-1}) were incubated at 30°C in standard reaction medium containing $1 \mu\text{M}$ CsA to prevent changes in light scattering due to mitochondrial swelling caused by Ca^{2+} . Panel A, line a, shows the addition of $10 \mu\text{M}$ AA, and panel B, line a, that of 50 nM FCCP. Other additions were: $1.0 \mu\text{M}$ carboxyatractylide (lines b), 200 nmol ADP and $2 \mu\text{g}$ oligomycin ml^{-1} (lines c), $2.0 \mu\text{M}$ catalase (lines d), 2 mM DTT (lines e), 1 mM EGTA (lines f), 5 mM β -hydroxybutyrate and 0.1 mM isocitrate (lines g) and $4 \mu\text{M}$ rotenone (lines h). Lines i represent control experiments, without additions.

3.3. Re-reduction of NAD(P)^+ by rotenone and NAD(P)H -linked substrates prevents PTP opening by AA or FCCP

Although very little is known about the structure and biological role of the PTP, the mechanisms of inhibition of the membrane permeability transition by ADP, DTT, catalase and CsA have been described and are related to direct or indirect interactions with the ANT (by ADP or CsA, respectively) or the antioxidant action of catalase and DTT. The following experiments were designed to ascertain whether re-reduction of NAD(P)^+ by rotenone or NAD(P)H -linked substrates correlated with their inhibitory effect against opening of the PTP. The combination of β -hydroxybutyrate and isocitrate promptly re-reduces NAD(P)^+ and reverses Ca^{2+} release from rat liver mitochondria treated with prooxidants [9,22]. Fig. 4 shows that β -hydroxybutyrate plus isocitrate (lines b), rotenone (lines c), or rotenone plus β -hydroxybutyrate and isocitrate (lines d), added after AA or FCCP (lines a), caused significant re-reduction of NAD(P)^+ . As expected, rotenone caused an almost complete reduction of NAD(P)^+ . This was faster when NAD(P) -linked substrates were added together. To assess whether the second phase of the $\Delta\psi$ disruption was the consequence of NAD(P)H oxidation, the changes in $\Delta\psi$ when these NAD(P)^+ reductants were added after the first phase of the $\Delta\psi$ decrease induced by AA or FCCP (lines a) were monitored. Fig. 5 shows that NAD(P)^+

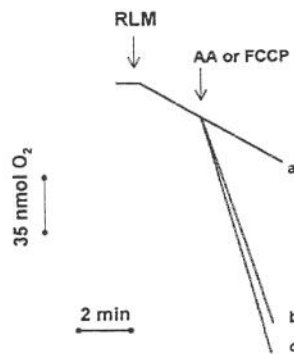


Fig. 3. Release of state 4 respiration by AA or FCCP. RLM (0.5 mg ml^{-1}) were incubated in standard reaction medium at 30°C . Line b shows the addition of $10 \mu\text{M}$ AA and line c, that of 50 nM FCCP. Line a represents control experiment without additions.

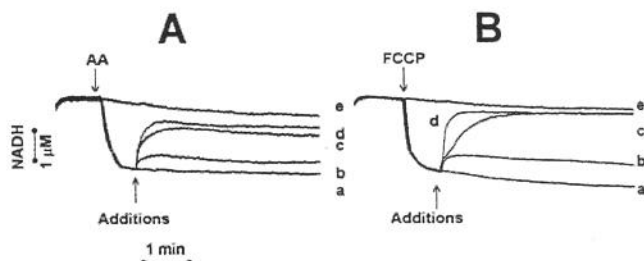


Fig. 4. NAD(P)^+ reduction induced by rotenone and NAD(P)H -linked substrates. RLM (0.5 mg ml^{-1}) were incubated in standard reaction medium at 30°C . Panel A, line a, shows the addition of $10 \mu\text{M}$ AA, and panel B, line a, that of 50 nM FCCP. Where indicated by the arrow, the following were added: 5 mM β -hydroxybutyrate and 0.1 mM isocitrate (lines b), $4 \mu\text{M}$ rotenone (lines c) and $4 \mu\text{M}$ rotenone, 5 mM β -hydroxybutyrate and 0.1 mM isocitrate (lines d). Lines e represent control experiments without additions.

re-reduction did indeed prevent the second phase of the $\Delta\psi$ decrease. When the re-reduction was more complete by the simultaneous addition of rotenone and NAD(P) -linked substrates, the $\Delta\psi$ returned almost to the level of the control experiment in panel A, line d. Lines e represent control experiments without AA or FCCP. The addition of antimycin A caused the collapse of $\Delta\psi$.

3.4. Characteristics of mitochondrial Ca^{2+} release induced by AA or FCCP

Fig. 6 shows that when RLM were added to a standard reaction medium containing 5 mM succinate and $30 \mu\text{M}$ CaCl_2 , most of the Ca^{2+} present was quickly taken up by mitochondria (lines e). The addition of $10 \mu\text{M}$ AA (panel A, line a) or 50 nM FCCP (panel B, line a) was followed by the release of accumulated and endogenous Ca^{2+} into the medium. The mitochondrial Ca^{2+} release induced by AA or FCCP was totally inhibited by rotenone (lines b), β -hydroxybutyrate plus isocitrate (lines c) or all of these together (lines d). Similar effects were obtained with ADP with or without oligomycin, DTT, CsA, catalase, but not with car-

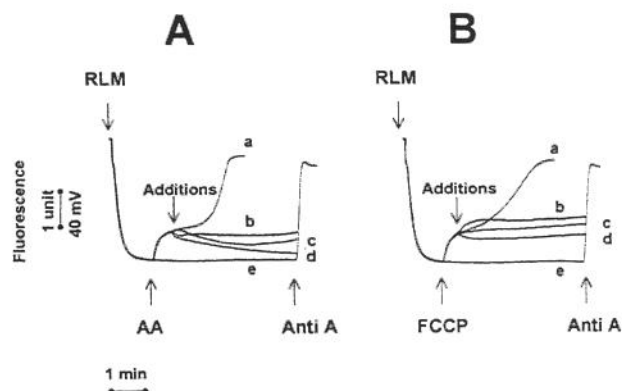


Fig. 5. Rotenone or NAD(P)H -linked substrates added after the initial protonophoric effect of AA or FCCP prevent $\Delta\psi$ disruption in Ca^{2+} -loaded RLM. RLM (0.5 mg ml^{-1}) were incubated at 30°C in medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, $\text{pH } 7.2$, 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM sodium succinate, $30 \mu\text{M}$ CaCl_2 and $5 \mu\text{M}$ safranin. In all experiments, $10 \mu\text{M}$ AA (panel A, line a) or 50 nM FCCP (panel B, line a) was added. Where indicated by the arrow, the following were added: 5 mM β -hydroxybutyrate and 0.1 mM isocitrate (lines b), $4 \mu\text{M}$ rotenone (lines c) and $4 \mu\text{M}$ rotenone, 5 mM β -hydroxybutyrate and 0.1 mM isocitrate (lines d). Lines e represent control experiments.

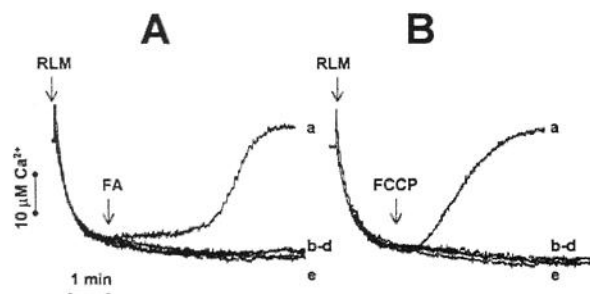


Fig. 6. Mitochondrial Ca^{2+} release induced by AA or FCCP: effects of β -hydroxybutyrate plus isocitrate or rotenone. RLM (0.5 mg ml^{-1}) were incubated in standard reaction medium containing $30 \text{ } \mu\text{M}$ CaCl_2 and $40 \text{ } \mu\text{M}$ arsenazo III. Panel A, line a, shows the addition of $10 \text{ } \mu\text{M}$ AA, and panel B, line a, that of 50 nM FCCP, in the presence of $4 \text{ } \mu\text{M}$ rotenone (lines b), 5 mM β -hydroxybutyrate plus 0.1 mM isocitrate (lines c) or $4 \text{ } \mu\text{M}$ rotenone, 5 mM β -hydroxybutyrate and 0.1 mM isocitrate (lines d). Lines e represent control experiments.

boxyatractylolide (not shown). The amount of Ca^{2+} released by antimycin A was the same in all the experimental conditions used (not shown). This eliminated the possibility that isocitrate could be protecting against PTP by chelating an appreciable amount of the cation.

4. Discussion

It is now widely accepted that the ANT is a component of the PTP assembly [12] and that the redox state of two of its thiol groups plays a crucial role in the mechanism of PTP opening [11]. Oxidation of these thiols by thiol reagents, reactive oxygen or via a redox link with the oxidized state of pyridine nucleotides (PN) facilitates PTP opening [13]. An earlier report [11] provided evidence that both cyclophilin D (CyP-D) binding and ADP displacement from distinct sites on the ANT increased the affinity of Ca^{2+} binding to the protein site(s) which trigger(s) pore opening. Both mechanisms appear to be stimulated by oxidation of the thiol groups on the ANT [11], a process that may also mediate the DTT-sensitive PTP opening induced by both AA and FCCP in the present work. Linolenic acid, which, together with AA, accounts for the bulk of mitochondrial phospholipids (see [24]), has an effect similar to that produced by AA (not shown).

The data presented here demonstrate that NAD(P)H and protein thiol oxidation associated with the stimulation of oxygen consumption induced by mild uncoupling by either FCCP or AA participate in the mechanism of PTP opening. This is illustrated by the inhibition of pore opening by either rotenone or NAD-linked substrates which significantly decrease NAD(P)H oxidation in RLM oxidizing succinate. If NAD(P) $^+$ is re-reduced by rotenone or NAD(P)H-linked substrates, opening of the PTP is also prevented. Therefore, a link between the thiol redox state of the translocase and that of NAD(P)H seems to underlie the mechanism of PTP opening by both AA and FCCP. In this regard, a decrease in the number of inner membrane protein sulfhydryl groups and ANT conformation is reportedly associated with the oxidation of PN in Ca^{2+} -loaded rat liver mitochondria [18]. PTP opening occurred under these conditions. The inhibition of pore opening by DTT (Fig. 1), a dithiol reductant, is consistent with this mechanism. On the other hand, ADP and CsA,

although unable to prevent NAD(P)H and, probably, ANT thiol oxidations, did inhibit PTP opening by a direct interaction with the inhibitory site on the ANT or by removing bound CyP-D, respectively. In both cases, the oxidation of ANT thiols was overcome by the effects of CsA and ADP [11]. Based on the present results, we propose that the ability of FA to open the PTP is, as in the case of FCCP, a consequence of NAD(P)H oxidation that occurs through an increase in the rate of respiration mediated by the protonophoric action of these compounds. In both situations, a condition of oxidative stress generated by the lack of reducing equivalents from NAD(P)H to the antioxidant system glutathione reductase/peroxidase favors PTP opening. This notion is strongly supported by the experiment showing that removal of H_2O_2 by exogenous catalase prevented the mitochondrial permeability transition. It is assumed that AA-induced uncoupling was mediated by ANT and the aspartate/glutamate antiporter as proposed by Samartsev et al. [5], since liver mitochondria do not contain a sufficient amount of uncoupling protein-2 [23]. This assumption was confirmed by the lack of the inhibitory effect of GDP on the first uncoupling phase (not shown).

The present results should also be discussed in view of the findings of Korshunov et al. [24] and Cocco et al. [25]. The first group presented evidence that micromolar concentrations of FA cause mild uncoupling and arrest ROS formation by rat heart mitochondria respiring on succinate in Ca^{2+} -free medium. The second group reported that AA and other FA interactions with intact bovine heart mitochondria, while causing uncoupling, also markedly inhibit uncoupled respiration at the level of respiratory complexes I and III, with a consequent stimulation of ROS production. Our results are not contrary to these studies since our experiments were carried out with Ca^{2+} -loaded rat liver mitochondria under experimental conditions in which there was only a slight difference in the rate of AA- and FCCP-induced uncoupling (Fig. 3). The accumulation of ROS is certainly a consequence of increased production resulting from the membrane perturbation caused by Ca^{2+} binding to negative phospholipids on the internal face of the inner mitochondrial membrane [26]. As previously proposed [27], this Ca^{2+} effect is potentiated when associated with the lack of reducing equivalents from NAD(P)H to feed the mitochondrial antioxidant systems.

Acknowledgements: The authors thank Dr. Petr Jezek and Dr. Roger F. Castilho for critical reading of the manuscript and Cláudia de Oliveira Silva for expert technical assistance. This work was partially supported by grants from the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX). R.C. is a doctoral student supported by a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal a Nível Superior (CAPES) fellowship.

References

- [1] Pressman, B.C. and Lardy, H.A. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* 21, 458–466.
- [2] Skulachev, V.P. (1991) *FEBS Lett.* 294, 158–162.
- [3] Jezek, P., Engstova, H., Zackova, M., Vercesi, A.E., Costa, A.D.T., Arruda, P. and Garlid, K. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 319–327.
- [4] Skulachev, V.P. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 100–124.
- [5] Samartsev, V.N., Mokhova, E.N. and Skulachev, V.P. (1997) *FEBS Lett.* 412, 179–182.

- [6] Wieckowski, M.R. and Wojtczak, L. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 414–417.
- [7] Wieckowski, M.R. and Wojtczak, L. (1998) *FEBS Lett.* 423, 339–342.
- [8] Chaves, E., Zazueta, C. and Garcia, N. (1999) *FEBS Lett.* 445, 189–191.
- [9] Vercesi, A.E. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 252, 171–178.
- [10] Bernardi, P., Broekemeier, K.M. and Pfeiffer, D.R. (1994) *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 509–517.
- [11] Halestrap, A.P., Woodfield, K.Y. and Connern, C.P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 3346–3354.
- [12] Green, D.R. and Reed, J.C. (1998) *Science* 281, 1309–1312.
- [13] Kowaltowski, A.J. and Vercesi, A.E. (1999) *Free Radical Biol. Med.* 26, 463–471.
- [14] Vercesi, A.E. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 305–310.
- [15] Hoek, J.B. and Rydström, J. (1988) *Biochem. J.* 254, 1–10.
- [16] Vercesi, A.E. and Hoffmann, M.E. (1993) *Methods in Toxicology*, Vol. 2, pp. 256–265, Academic Press, New York.
- [17] Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J.H. and Vercesi, A.E. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 2929–2934.
- [18] Le-Quoc, D. and Le-Quoc, K. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 273, 466–478.
- [19] De Valck, D., Vercammen, D., Fiers, W. and Beyaert, R. (1998) *J. Cell. Biochem.* 71, 392–399.
- [20] Åkerman, K.E.O. and Wikström, M.K.F. (1976) *FEBS Lett.* 68, 191–197.
- [21] Scarpa, A. (1979) *Methods Enzymol.* 56, 301–338.
- [22] Vercesi, A.E. (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 86–91.
- [23] Larrouy, D., Laharrague, P., Carrera, G., Viguerie-Bascands, N., Levi-Meyrueis, C., Fleury, C., Pecquer, C., Nibbelink, M., Andre, M., Casteilla, L. and Ricquier, D. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 760–764.
- [24] Korshunov, S.S., Korkina, O.V., Ruuge, E.K., Skulachev, V.P. and Starkov, A.A. (1998) *FEBS Lett.* 435, 215–218.
- [25] Cocco, T., Di Paola, M., Papa, S. and Lorusso, M. (1999) *Free Radical Biol. Med.* 27, 51–59.
- [26] Grijalba, M.T., Vercesi, A.E. and Schreier, S. (1999) *Biochemistry* 38, 13279–13287.
- [27] Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R. and Castilho, R.F. (1997) *Biosci. Rep.* 17, 43–52.

4.1.4 Discussão do 1º trabalho

É amplamente aceito atualmente que ANT é um dos componentes estruturais do PTP (GREEN & REED, 1998) e que o estado redox de dois de seus grupos tióis tem um papel crucial no mecanismo de abertura do PTP (HALESTRAP *et al*, 1997). A oxidação desses tióis pelos reagentes tiólicos, pelo oxigênio reativo ou pelo estado oxidado dos nucleotídeos de piridina (NP) facilita a abertura do PTP (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Um recente trabalho (HALESTRAP *et al*, 1997) demonstra que ambos, a ligação de ciclofilina D (CyP-D) e o deslocamento de ADP de sítios distintos no ANT, aumentam a afinidade da ligação de Ca^{2+} aos sítios da(s) proteína(s) que engatilha(m) a abertura do poro. Ambos mecanismos parecem estar estimulados pela oxidação de grupos tióis no ANT (HALESTRAP *et al*, 1997), um processo que, como neste presente trabalho, pode também mediar a abertura de um poro induzido por AA e FCCP, sensível a DTT. Ácido linoleico que, juntamente com AA, constitui a maior parte dos fosfolípidos mitocondriais (KORSHUNOV *et al*, 1998), teve um efeito similar àquele produzido por AA (não mostrado).

Os resultados aqui apresentados demonstram que NAD(P)H e a oxidação de tióis de proteínas, associados à estimulação do consumo de oxigênio, induzidos por ameno desacoplamento ou por FCCP ou por AA, participam no mecanismo de abertura do PTP. Isto é ilustrado pela inibição da abertura do poro ou pela rotenona ou pelos substratos do NAD(P)H, os quais diminuem significativamente a oxidação do NAD(P)H, em MFR oxidando succinato. Se NAD(P)⁺ é re-reduzido, devido a inibição da respiração pela rotenona, ou, pela adição de substratos do NAD(P)H, a abertura do PTP é também prevenida. Assim, a abertura do PTP tanto por AA quanto por FCCP, pode estar vinculada à associação entre o estado redox dos tióis da translocase e do NAD(P)H. Sob este ponto de vista, a diminuição do número de grupos sulfidrilas das proteínas da membrana mitocondrial interna e a conformação do ANT está associada a oxidação dos NP em MFR incubadas na presença de Ca^{2+} (LE-QUOC & LE-QUOC, 1989). A inibição da abertura do poro por DTT (Fig. 1), um redutor ditiol,

é consistente com esse mecanismo. Por outro lado, ADP e CsA, embora incapazes de prevenir a oxidação do NAD(P)H e, provavelmente, a oxidação dos tióis do ANT, inibiu a abertura do PTP pela interação direta com o sítio inibitório do ANT ou por remoção da ligação de CyP-D, respectivamente. Em ambos casos, a oxidação de tióis do ANT foi superada pelos efeitos de CsA e ADP (HALESTRAP *et al*, 1997). Com base nos presentes resultados, propomos que a habilidade dos FA em abrir o PTP é, como no caso do FCCP, uma consequência da oxidação do NAD(P)H, que ocorre através de um aumento na velocidade de respiração, mediada pela ação protonofórica destes compostos. Em ambas situações, a condição de estresse oxidativo gerado pela falta de equivalentes redutores do NAD(P)H, para o sistema antioxidante glutathione redutase/glutathione peroxidase, favorece a abertura do PTP. Esta proposta é fortemente apoiada pelos experimentos mostrando que a remoção de H₂O₂ por catalase exógena preveniu a TPM. Assumiu-se que o desacoplamento induzido por AA foi mediado pelo ANT e pelo trocador aspartato/glutamato, como proposto por Samartsev e colaboradores (SAMARTSEV *et al*, 1997), uma vez que mitocôndrias de fígado não contém quantidades suficientes de Ucp₂ (LARROUY *et al*, 1997). Esta proposição foi confirmada pela ausência de efeito inibitório do GDP, na primeira fase de desacoplamento (resultado não mostrado).

Os resultados aqui apresentados podem também ser discutidos sob os pontos de vistas das descobertas de Korshunov e colaboradores (KORSHUNOV *et al*, 1998) e Cocco e colaboradores (COCCO *et al*, 1999). O primeiro grupo apresentou evidências de que concentrações micromolares de FA causam ameno desacoplamento e detêm a formação de EROs pela mitocôndria de coração, respirando com succinato, em meio isento de Ca²⁺. O segundo grupo relatou que interações de AA e outros FA com mitocôndrias de coração de boi, enquanto causavam desacoplamento, inibiam marcadamente a respiração desacoplada nos complexos respiratórios I e III, com a consequente estimulação da produção de EROs. Nossos resultados não são contrários a estes estudos, uma vez que nossos experimentos foram elaborados com mitocôndrias de fígado de rato, incubadas na presença de Ca²⁺, sob condições experimentais,

que tiveram somente uma ligeira diferença na velocidade de desacoplamento induzidos por AA ou FCCP (Fig. 3). O acúmulo de EROs é certamente consequência de aumento de sua produção, resultante da perturbação da membrana causada pela ligação de Ca^{2+} aos fosfolipídeos de carga negativa, na face interna da membrana mitocondrial interna (GRIJALBA *et al*, 1999). Como proposto anteriormente (VERCESI *et al*, 1997A), este efeito de Ca^{2+} se encontra potencializado quando associado à ausência de equivalentes redutores do NAD(P)H, para suprir os sistemas mitocondriais antioxidantes.

4.2. - 2º Trabalho

ROSANA CATISTI, SERGIO A. UYEMURA, ROBERTO DOCAMPO, ANIBAL VERCESI. Calcium mobilization by arachidonic acid in Trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105: 261-271, 2000.

4.2.1. Resumo do 2º trabalho

Uma recente publicação (EINTRACHT, J., MAATHAI, R., MELLORS, A. AND RUBEN, L., 1998, *Biochem. J.* **336**, 659-666) propõe que a entrada de cálcio em formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* é regulada pela enzima fosfolipase A₂, que hidroliza fosfolipídeos da membrana plasmática, gerando ácido araquidônico, que promove a abertura de canais de cálcio nesta membrana. Esta interpretação é apoiada por resultados que mostram o estímulo da entrada de cálcio por melitina, um peptídeo que ativa a fosfolipase A₂, e por ácidos graxos insaturados, e a sua inibição por inibidores da fosfolipase A₂. Neste trabalho mostra-se que em formas tripomastigotas procíclicas de *Trypanosoma brucei*, promastigotas de *Leishmania donovani* e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, o influxo de cálcio é estimulado pela melitina, de maneira dose-dependente (50 – 400 nM). Este efeito é bloqueado pelo inibidor da fosfolipase A₂ ácido 3-(4-octadecil)-benzoilacrílico (OBAA). O ácido graxo insaturado, ácido araquidônico, utilizado na faixa de concentração de 10 a 75 µM também induz o influxo de cálcio, num mecanismo sensível a LaCl₃. Entretanto, melitina e AA induzem um aumento na [Ca²⁺]_i em *T. brucei*, quando incubados em meio livre de Ca²⁺, indicando mobilização de Ca²⁺ de organelas intracelulares. Essa hipótese foi sugerida pelos experimentos mostrando que AA promove liberação de Ca²⁺ de acidocalcisomas nestas células. Os resultados mostrando mudanças no potencial de membrana mitocondrial, liberação de alaranjado de acridina e Ca²⁺ dos acidocalcisomas, e transporte de Ca²⁺ através da membrana plasmática, sugerem que, em adição à possível estimulação nos

processos mediados por canais de Ca^{2+} , AA, na faixa de concentração aqui utilizada, tem outros efeitos não específicos em membranas de tripanossomatídeos.

4.2.2 Introdução ao 2º trabalho

Protozoários parasitas são agentes etiológicos de doenças que afetam milhões de pessoas no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991). A quimioterapia empregada contra esses parasitas apresenta muitas deficiências, incluindo baixa especificidade, toxicidade e resistência a drogas. Assim, é muito importante identificar processos bioquímicos que possam ser utilizados como alvos para o desenvolvimento racional de melhores terapias. Desta forma, a compreensão dos mecanismos que controlam a homeostase de cálcio nestes parasitas recebeu importante atenção nos últimos anos (para revisão veja BENAÏM, 1996; DOCAMPO & MORENO, 1996). Está bem estabelecido que a viabilidade celular requer um perfeito funcionamento desses mecanismos e que a alteração na homeostase de cálcio por toxinas ou condições patológicas levam à morte celular (BERRIDGE, 1997). Além disso, foi descrito que cálcio desempenha papel importante no processo de invasão celular pelos diferentes parasitas (MORENO *et al*, 1994; DOCAMPO & MORENO, 1996).

Estudos prévios, no que se refere a homeostase de cálcio em tripanossomatídeos, demonstram que a maioria dessas células possuem três reservatórios intracelulares de cálcio: retículo endoplasmático, mitocôndria e acidocalcisoma (DOCAMPO & VERCESI, 1989A, 1989B, VERCESI *et al*, 1991A, 1991B, 1994B, 1997B; VERCESI & DOCAMPO, 1992, 1996; MORENO *et al*, 1992A; DOCAMPO *et al*, 1995; LU *et al*, 1997, 1998; SCOTT *et al*, 1997, 1998; RODRIGUES *et al*, 1999). A captação de cálcio pela mitocôndria ocorre por mecanismo eletroforético, é inibido por antimicina A, FCCP e vermelho de rutênio, e é estimulado por substratos respiratórios, fosfato e acetato. Esse reservatório tem alta capacidade e baixa afinidade por cálcio e é capaz de tamponar o cálcio externo em concentrações na faixa de 0.6-0.7 μM , como

ocorre em mitocôndria de vertebrados (DOCAMPO & VERCESI, 1989A, 1989B; VERCESI *et al*, 1991A, 1991 B; VERCESI & DOCAMPO, 1992; MORENO *et al*, 1992A). A captação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático ocorre via Ca^{2+} -ATPase e é inibida por altas concentrações de vanadato e agentes anticalmodulina. Esse reservatório tem baixa capacidade e alta afinidade por Ca^{2+} e é capaz de tamponar o Ca^{2+} externo em concentrações na faixa de 0.05-0.1 μM (VERCESI *et al*, 1991A, 1991 B; VERCESI & DOCAMPO, 1992; MORENO *et al*, 1992A). Os acidocalcisomas são vacúolos ácidos, presentes em tripanossomatídeos, que contêm uma considerável fração do Ca^{2+} intracelular (VERCESI *et al*, 1994B; DOCAMPO *et al*, 1995; LU *et al*, 1997; SCOTT *et al*, 1997, 1998). Eles possuem uma H^{+} -ATPase e/ou uma H^{+} -pirofosfatase que acidificam seu interior, uma Ca^{2+} -ATPase para captação de Ca^{2+} e um trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^{+}$ para saída de Ca^{2+} (VERCESI *et al*, 1994B; DOCAMPO *et al*, 1995; LU *et al*, 1997; SCOTT *et al*, 1997, 1998). Um trocador $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ que pode participar na liberação de Ca^{2+} dessas organelas já foi também descrito (VERCESI & DOCAMPO, 1996; VERCESI *et al*, 1997B; RODRIGUES *et al*, 1999).

Em vários tipos de tecidos a concentração de Ca^{2+} livre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) aumenta devido à ativação da hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-difosfato, com liberação de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), ambos atuando como segundos mensageiros (NISHIZUKA, 1984; BERRIDGE, 1987). Esta hidrólise é catalizada pela fosfolipase C, num mecanismo tipo agonista/receptor. O IP_3 promove a liberação de cálcio de compartimentos intracelulares (retículo endoplasmático e/ou acidocalcisomas), enquanto DAG estimula a proteína C quinase (NISHIZUKA, 1984; BERRIDGE, 1987). O esvaziamento dos compartimentos intracelulares de Ca^{2+} promove influxo de Ca^{2+} do meio extracelular por um processo denominado influxo capacitativo, isto é, o conteúdo de Ca^{2+} dos compartimentos intracelulares regulam os canais condutores de Ca^{2+} na membrana plasmática (PUTNEY, 1990; MONTERO *et al*, 1991, GEISZT *et al*, 1995). Apesar da entrada capacitativa ser observada em diversos tecidos, este não deve ser o único mecanismo de aumento da entrada de cálcio em células não excitáveis (SHUTTLEWORTH & THOMPSON, 1998).

Neste sentido, foi descrito recentemente um mecanismo de entrada de cálcio não-capacitativa, que parece envolver uma via ativada por araquidonato (SHUTTLEWORTH, 1996; SHUTTLEWORTH & THOMPSON, 1998).

Embora tenha sido demonstrada a presença de uma via inositol fosfato/diacilglicerol em tripanossomatídeos (DOCAMPO & PIGNATARO, 1991; MORENO *et al*, 1992A, 1992B; DOCAMPO *et al*, 1993), o IP_3 mostrou ser incapaz de liberar Ca^{2+} de compartimentos intracelulares (DOCAMPO & PIGNATARO, 1991; MORENO *et al*, 1992A, 1992B; DOCAMPO *et al*, 1993). Além disso, a presença da entrada de cálcio capacitativa é incerta (EINTRACHT *et al*, 1998). Uma recente publicação (EINTRACHT *et al*, 1998) propõe que a entrada de cálcio na forma sanguícola tripomastigota de *Trypanosoma brucei* é regulada via geração de ácido araquidônico mediado pela fosfolipase A_2 , similar ao mecanismo de entrada de cálcio não-capacitativa (SHUTTLEWORTH, 1996; SHUTTLEWORTH & THOMPSON, 1998).

Neste trabalho investigou-se o possível papel de ácidos graxos na homeostase de cálcio nas formas tripomastigotas de *T. brucei* procíclicos, promastigotas de *Leishmania donovani* e amastigotas de *T. cruzi*. Os resultados confirmaram o papel da sinalização via fosfolipase A_2 como mediador da entrada de cálcio, embora haja algumas dúvidas sobre o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) os ácidos graxos afetam a mobilização de cálcio nestes parasitas.

4.2.3 2º trabalho: Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids.

Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids

Rosana Catisti ^{a,b}, Sergio A. Uyemura ^{a,1}, Roberto Docampo ^a,
Anibal E. Vercesi ^{a,b,*}

^a Laboratory of Molecular Parasitology, Department of Pathobiology, University of Illinois at Urbana-Champaign,
2001 South Lincoln Avenue, Urbana, IL 61802, USA

^b Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas,
S.P. 13083-970, Brazil

Received 14 July 1999; received in revised form 1 October 1999; accepted 4 October 1999

Abstract

A recent report (Eintracht J, Maathai R, Mellors A, Ruben L. Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A₂ and arachidonic acid, Biochem J 1998;336:659–66) provided evidence that calcium entry in *Trypanosoma brucei* bloodstream trypomastigotes is regulated via a signaling pathway involving phospholipase A₂-mediated generation of arachidonic acid and stimulation of a plasma membrane-located calcium channel. Here we show that Ca²⁺ influx in *T. brucei* procyclic trypomastigotes, *Leishmania donovani* promastigotes and *T. cruzi* amastigotes was also stimulated in a dose-dependent manner (50–400 nM) by the amphiphilic peptide melittin. This effect was blocked by the phospholipase A₂ inhibitor 3-(4-octadecyl)-benzoylacrylic acid. The unsaturated fatty acid arachidonic acid, in the range of 10–75 μM, induced Ca²⁺ entry by a mechanism sensitive to LaCl₃. However, both melittin and arachidonic acid induced an increase in [Ca²⁺]_i in *T. brucei* procyclic trypomastigotes incubated in Ca²⁺-free medium implying Ca²⁺ mobilization from intracellular stores. This hypothesis was supported by experiments showing that arachidonic acid promoted Ca²⁺ release from the acidocalcisomes of these cells. The results showing changes in mitochondrial membrane potential, release of acridine orange and Ca²⁺ from the acidocalcisomes and Ca²⁺ transport across the plasma membrane suggest that in addition to the possible stimulation of a Ca²⁺ channel-mediated process, arachidonic acid, in the range of concentrations used here, have other nonspecific effects on the trypanosomatids membranes. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Acidocalcisome; Mitochondria; Arachidonic acid; Calcium; Trypanosomatids

* Corresponding author. Tel.: +1-217-333-3845; fax: +1-217-244-7421.

E-mail address: anibal@obelix.unicamp.br (A.E. Vercesi)

¹ Present address: Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14040-903, Brazil.

1. Introduction

Parasitic protozoans are the etiological agents of diseases that affects millions of people worldwide [1]. The current chemotherapy against these parasites suffer from many deficiencies, including low specificity, toxicity and drug resistance. Therefore, it is very important to search for biochemical targets that could be exploited for rational development of improved therapies. In this regard, the understanding of the mechanisms involved in the control of Ca^{2+} homeostasis in these parasites received important attention in the last years (for reviews see Refs. [2,3]). It is very well known that cell viability requires a perfect functioning of these mechanisms and that disruption of Ca^{2+} homeostasis by toxins or pathological conditions leads to cell death [4]. In addition, a role for Ca^{2+} in the process of cell invasion by different parasites has been described [3,5].

Previous studies concerning Ca^{2+} homeostasis in trypanosomatids have demonstrated that most of these cells have three intracellular Ca^{2+} pools: endoplasmic reticulum, mitochondria and acidocalcisomes [6–20]. Mitochondrial Ca^{2+} uptake occurs by an electrophoretic mechanism, is inhibited by antimycin A, FCCP, and ruthenium red, and is stimulated by respiratory substrates, phosphate and acetate. This pool has a high capacity and low affinity for Ca^{2+} and is able to buffer external Ca^{2+} at concentrations in the range of 0.6–0.7 μM as occurs with vertebrate mitochondria [6–11]. Ca^{2+} uptake by the endoplasmic reticulum occurs via a Ca^{2+} -ATPase and is inhibited by high concentrations of vanadate and anticalmodulin agents. This pool has a low capacity and a high affinity for Ca^{2+} and is able to buffer external Ca^{2+} at concentrations in the range of 0.05–0.1 μM [8–11]. Acidocalcisomes are acidic vacuoles present in trypanosomatids that contain a considerable fraction of intracellular Ca^{2+} [12–16]. They possess a vacuolar-type H^{+} -ATPase and/or a vacuolar H^{+} -pyrophosphatase for H^{+} uptake, a $\text{Ca}^{+}/\text{H}^{+}$ countertransporting ATPase for Ca^{2+} uptake and a $\text{Ca}^{2+}/\text{nH}^{+}$ antiporter for Ca^{2+} release [12–16]. A $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter that may participate in Ca^{2+} release from these organelles has been de-

scribed also [17–20]. Ca^{2+} release from the acidic vacuoles can be also induced via internal alkalization by nigericin, a $\text{K}^{+}/\text{H}^{+}$ ionophore [12].

In a wide variety of cell types the level of intracellular free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) is thought to rise as a result of agonist/receptor activation of phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, with release of inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG), both of which act as second messengers [21,22]. IP_3 functions to release calcium from intracellular stores (possibly the endoplasmic reticulum or calciosomes), while DAG stimulates protein kinase C [21,22]. Emptying of the internal Ca^{2+} stores initiates Ca^{2+} influx from the extracellular milieu, i.e. the Ca^{2+} content of the stores regulates Ca^{2+} -conducting channels in the plasma membrane [23,24]. This Ca^{2+} entry is often referred to as capacitative or store-operated Ca^{2+} influx [25]. Although capacitative calcium entry can be clearly demonstrated in a variety of different cells, it is far from certain that such a mechanism is the only one involved in the increase in calcium entry in non-excitable cells following receptor activation [26]. In this regard, a non-capacitative calcium entry mechanism that appears to involve an arachidonate-activated pathway has been described recently [26,27].

Although the presence of an inositol phosphate/diacylglycerol pathway has been demonstrated in trypanosomatids [11,28–30] IP_3 has been shown to be unable to release Ca^{2+} from their intracellular stores [11,29,30], and the presence of a capacitative calcium entry is uncertain [31]. A recent report [31] proposed that calcium entry in *Trypanosoma brucei* bloodstream trypomastigotes is regulated via a signaling pathway involving phospholipase A_2 -mediated generation of arachidonic acid with similarities to the non-capacitative calcium entry mechanism [26,27].

Since nonesterified long-chain fatty acids, even at low concentrations (5–10 μM), are known to move across phospholipid bilayer carrying H^{+} , Na^{+} , K^{+} [32,33] and possibly other cations, we examined the mechanisms involved in arachidonic acid-induced calcium mobilization in trypanosomatids. Although the results support a role for a phospholipase A_2 -mediated signaling pathway of

calcium entry across the plasma membrane, and possibly across the acidocalcisomes, they also indicate that care should be taken in the interpretation of the data because in the same range of concentration arachidonic acid induces other transport processes across the plasma, acidocalcisomes and mitochondrial membranes.

2. Materials and methods

2.1. Culture methods

T. brucei procyclic forms (IL Tar 1 procyclics) and *Leishmania donovani* promastigotes (S-2 strain) were grown at 28°C in medium SDM-79 [34] supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum. At 2–3 days after inoculation, cells were collected by centrifugation and washed twice in a buffer (buffer A) containing 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 5.5 mM glucose and 50 mM Hepes, pH 7.2, and resuspended in the same buffer. *T. cruzi* amastigotes (Y strain) were obtained from the culture medium of L₆E₉ myoblasts by a modification of the method of Schmatz and Murray [35] as described previously [29]. The final concentration of cells was determined using a Neubauer chamber. The protein concentration was determined by the biuret assay [36] in the presence of 0.2% deoxycholate.

2.2. Chemicals

ATP, antimycin A, arsenazo III, digitonin, EGTA, 2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes), LaCl₃, melittin, nigericin, 3-(4-octadecyl)-benzoylacrylic acid (OBAA), oligomycin, arachidonic acid, linoleic acid, linolenic acid, and calcium ionophore A23187 were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Fura-2/AM (1-{2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxyl}-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid/acetoxymethyl ester) were obtained from Molecular Probes, Eugene, OR. All other reagents were of analytical grade.

2.3. Determination of Ca²⁺ movements

Variations in free Ca²⁺ concentrations were monitored by measuring the changes in the absorbance spectrum of arsenazo III [37] using the SLM Aminco DW2000 spectrophotometer at the wavelength pair 675–685 nm. The concentration of the ionic species and complexes at equilibrium were calculated by employing an iterative computer program, as described previously [11]. Each experiment was repeated at least three times, except the dose response curve (Fig. 7B) in which each measurement supports the others, and the figures show representative experiments.

2.4. Spectrofluorometric determinations

Fura-2 determinations were performed essentially as described by Philosoph and Zilberstein [38]. After harvesting, the cells were washed twice at 1500 × g for 10 min at 4°C in buffer A, which contained 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 5.5 mM D-glucose and 50 mM Hepes, pH 7.2 [38]. Cells were resuspended to a final density of 10⁹ cells ml⁻¹ in loading buffer which contained 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 5.5 mM D-glucose, 50 mM Hepes, pH 7.2 and 6 μM fura 2-AM. The suspensions were incubated for 30 min in a 30°C water bath with mild agitation. Subsequently, the cells were washed twice with ice-cold buffer A to remove extracellular dye. Cells were resuspended to a final density of 10⁹ cells ml⁻¹ in buffer A and were kept on ice [38]. For fluorescence measurements, a 50 μl sample of the cell suspension was diluted into 2.5 ml of buffer A (5 × 10⁷ cells ml⁻¹, final density) in a cuvette placed in a thermostatically regulated (30°C) Hitachi F-2000 spectrofluorimeter. Excitation was at 340 and 380 nm and emission was at 510 nm. The fura-2 fluorescence response to [Ca²⁺]_i concentration was calibrated from the ratio of 340/380 nm fluorescence values after subtraction of the background fluorescence of the cells at 340 and 380 nm as described by Grynkiewicz et al. [39]. [Ca²⁺]_i concentration was calculated by titration with different concentrations of Ca²⁺–EGTA buffers [11]. Each experiment was repeated at least three times, except the

dose response curves in which each measurement supports the others, and the figures show representative experiments.

2.5. Proton pump activity

Acidification of acidocalcisomes in digitonin-permeabilized cells was monitored by measuring the changes in the absorbance spectrum of acridine orange [40] by using an SLM Aminco DW 2000 spectrophotometer at the wavelength pair 493–530 nm. Cells (5×10^7 cells ml^{-1} final density) were incubated at 30°C in 2.5 ml of

standard reaction medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 2 mM potassium phosphate, 2 mM MgCl_2 , 10 mM Hepes buffer, pH 7.2, 0.5 mM ATP, $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ antimycin A, $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ oligomycin and digitonin ($20 \mu\text{M}$) for 2 min before addition of acridine orange ($3 \mu\text{M}$).

2.6. Mitochondrial membrane potential in situ

Estimation of mitochondrial membrane potential in situ was done spectrophotometrically using the indicating dye safranin O ($10 \mu\text{M}$), at 30°C [9,41]. Absorbance changes were monitored in an SLM Aminco DW 2000 spectrophotometer at the wavelength pair 511–533 nm [9,41]. Each experiment was repeated at least three times with different cell preparations and the figure shows representative experiments.

3. Results

3.1. Melittin stimulates Ca^{2+} entry in *T. brucei* procyclic trypomastigotes, *L. donovani* promastigotes and *T. cruzi* amastigotes

The effects of melittin on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were determined in intact cells loaded with the fluorescent Ca^{2+} indicator fura-2/AM, in reaction medium containing either 2 mM CaCl_2 or 1 mM EGTA. The addition of 200 nM melittin (Fig. 1, panel A), caused an increase of ~ 800 nM in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (line a), from ~ 150 to 950 nM, when *T. brucei* procyclics were suspended in medium containing 2 mM CaCl_2 . In the absence of CaCl_2 (1 mM EGTA), melittin caused an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from 50 to 100 nM (line c) indicating calcium release from intracellular stores, contrary to a previous report using *T. brucei* bloodstream forms [31]. To determine whether a PLA_2 might be involved in the pathway by which melittin initiates Ca^{2+} influx, we studied the melittin response in the presence of the PLA_2 inhibitor 3-(4-octadecyl)-benzoylacrylic acid (OBAA) [31]. In agreement with previous results obtained with *T. brucei* bloodstream forms [31], the presence of $5 \mu\text{M}$ OBAA (lines b and d) inhibited completely the melittin effect. A dose-dependent change in

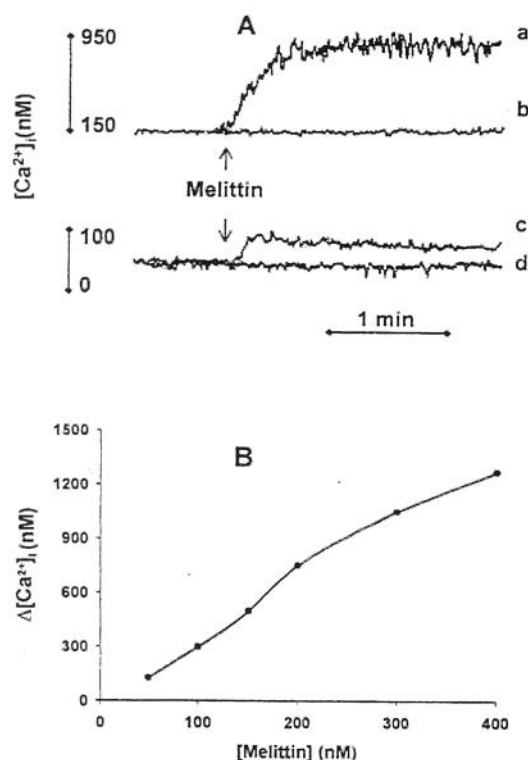


Fig. 1. Melittin increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in *T. brucei* procyclic trypomastigotes. Cells ($5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) were loaded with fura 2/AM, as described in Section 2 and subsequently suspended in buffer containing 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO_4 , 5.5 mM glucose, 50 mM Hepes, pH 7.2 and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was analysed. Panel A shows the changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after addition of 200 nM melittin when cells were suspended in the presence of 2 mM CaCl_2 (line a); $5 \mu\text{M}$ OBAA and 2 mM CaCl_2 (line b); 1 mM EGTA (line c) or $5 \mu\text{M}$ OBAA and 1 mM EGTA (line d). Panel B, cells were treated with different concentrations of melittin, and the $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ above baseline levels were recorded.

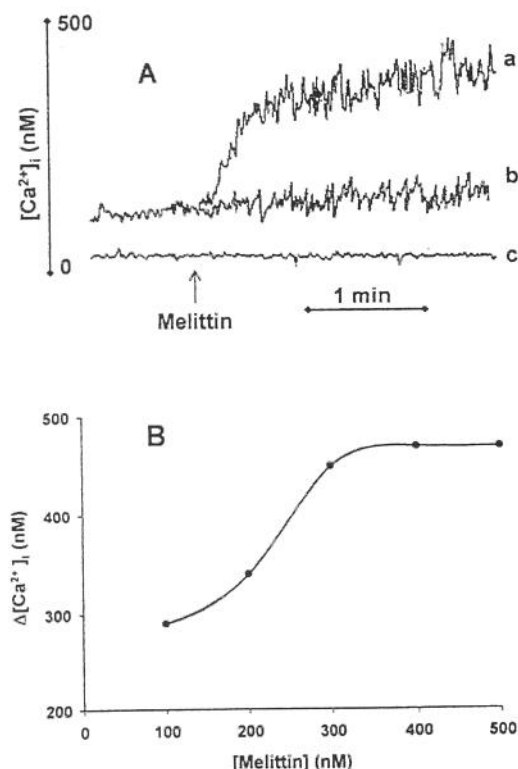


Fig. 2. Melittin stimulates Ca^{2+} entry into *L. donovani* promastigotes. Cells ($5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) were loaded with fura 2/AM and suspended in the same buffer described in Fig. 1. Panel A shows the change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after addition of 200 nM melittin in the presence of 2 mM CaCl_2 (line a); 5 μM OBAA (line b) or 1 mM EGTA (line c). Panel B, cells were treated with different concentrations of melittin, and the $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ above baseline levels were recorded.

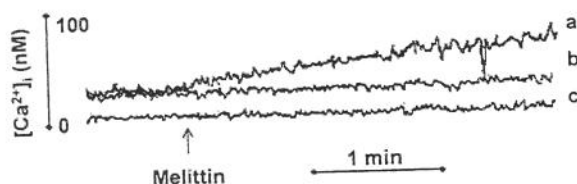


Fig. 3. Melittin stimulates Ca^{2+} entry into *T. cruzi* amastigotes. Cells ($5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) were loaded with fura 2/AM and suspended in the same buffer described in Fig. 1. The figure shows $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after addition of 200 nM melittin in the presence of 2 mM CaCl_2 (line a); 5 μM OBAA and 2 mM CaCl_2 (line b) or 1 mM EGTA (line c).

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed over the range of melittin concentrations from 50–400 nM (Fig. 1, panel B). In *L. donovani* (Fig. 2, panel A), the addition of

200 nM melittin caused an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from 100 to about 440 nM (line a) when the cells were suspended in medium containing 2 mM CaCl_2 . This change was inhibited by addition of 5 μM OBAA (line b) or 1 mM EGTA (line c). Fig. 2B shows a dose-dependent change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ when *L. donovani* were treated with different concentrations of melittin (100–500 nM). The addition of 200 nM melittin to *T. cruzi* amastigotes (Fig. 3), in the presence of 2 mM CaCl_2 , caused a slow increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from 30 to ~75 nM (line a) which was completely inhibited by 5 μM OBAA (line b) or 1 mM EGTA (line c).

3.2. Arachidonic acid stimulates Ca^{2+} influx in *T. brucei* procyclic trypomastigotes, *L. donovani* promastigotes and *T. cruzi* amastigotes: effects of LaCl_3 and ibuprofen

The effect of arachidonic acid on Ca^{2+} influx in trypanosomatids was analysed in fura-2 loaded cells incubated in reaction medium containing 2 mM CaCl_2 . An increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in *T. brucei* procyclics (Fig. 4, panel A) was observed at different arachidonic acid concentrations (75, 50, 30, 20, 0 μM , lines a–e, respectively). A dose-dependent elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by arachidonic acid was verified also in *L. donovani* promastigotes and *T. cruzi* amastigotes (Fig. 4 panel B).

In the experiments of Fig. 5 we investigated the effect of LaCl_3 , an inhibitor of Ca^{2+} channels, and ibuprofen, an inhibitor of cyclooxygenase which prevents the production of prostaglandins, on Ca^{2+} influx stimulated by arachidonic acid. The addition of 50 μM arachidonic acid caused an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to ~200 nM when *T. cruzi* amastigotes (Fig. 5, panel A, line a) were suspended in medium containing 2 mM CaCl_2 . This effect was partially inhibited by 100 μM LaCl_3 (line d) or 1 mM EGTA (line c) but not by the cyclooxygenase inhibitor ibuprofen (100 μM , line b). When *L. donovani* (Fig. 5, panel B, line a) were suspended in medium containing 2 mM CaCl_2 the addition of 50 μM arachidonic acid caused an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from 100 to 500 nM. This effect was inhibited completely by 100 μM LaCl_3 (line b) or 1 mM EGTA (line c) but not by 100 μM ibuprofen (not shown).

3.3. Effect of different arachidonic acid concentrations on $[Ca^{2+}]_i$ in *T. brucei* procyclic trypomastigotes suspended in Ca^{2+} -free medium

When *T. brucei* procyclics were suspended in medium containing 1 mM EGTA the addition of 75 μ M arachidonic acid caused a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ from 50 to 90 nM (Fig. 6, line a) which was followed by a fast decrease in $[Ca^{2+}]_i$ to $\sim$ 10 nM. The addition of 50 μ M arachidonic acid (line b), caused an increase in $[Ca^{2+}]_i$ to

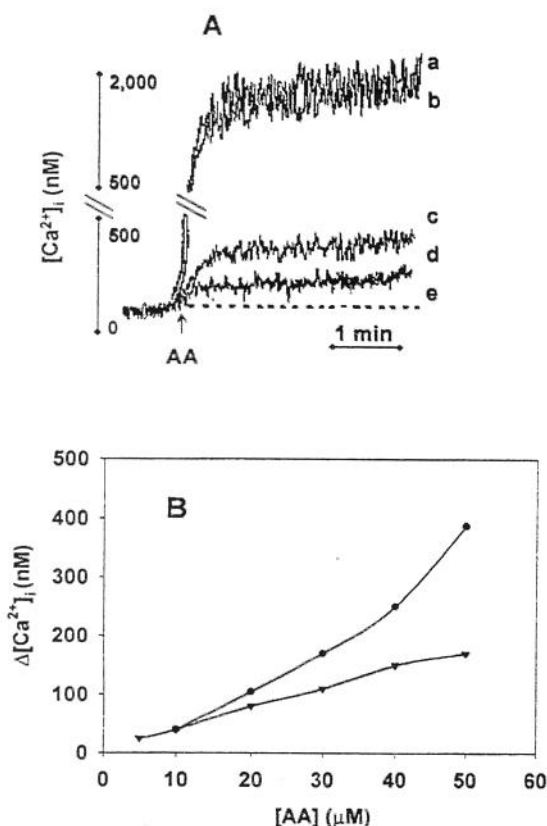


Fig. 4. Arachidonic acid stimulates Ca^{2+} entry into trypanosomatids. Cells (5×10^7 ml $^{-1}$) were loaded with fura 2/AM and suspended in the same buffer described in Fig. 1, in the presence of 2 mM $CaCl_2$. Arachidonic acid (AA), at different concentrations (75, 50, 30, 20, 0 μ M, a–e, respectively), was added where indicated in panel A (*T. brucei* procyclic trypomastigotes). In panel B, *L. donovani* promastigotes (●) or *T. cruzi* amastigotes (▼) were treated with different doses of AA, and the $\Delta[Ca^{2+}]_i$ above baseline levels were recorded and the values plotted were obtained from the plateau obtained within a period of 5 min.

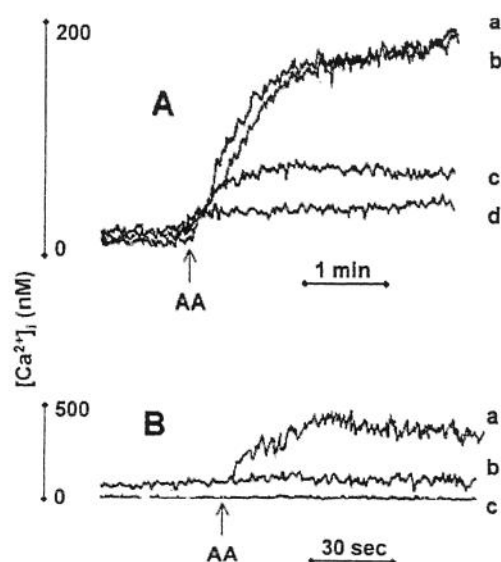


Fig. 5. The arachidonic acid-induced Ca^{2+} influx was inhibited by $LaCl_3$, but not by ibuprofen. Panel A, *T. cruzi* amastigotes (5×10^7 ml $^{-1}$) were loaded with fura 2/AM, and suspended in the buffer described in Fig. 1, in the presence of 2 mM $CaCl_2$. Arachidonic acid (AA, 50 μ M) was added where shown: line a, alone; line b, plus 100 μ M ibuprofen; line c, plus 1 mM EGTA; line d, plus 100 μ M $LaCl_3$. Panel B, *L. donovani* promastigotes (5×10^7 ml $^{-1}$). Arachidonic acid (AA, 50 μ M) was added where shown: line a, alone; line b, plus 100 μ M $LaCl_3$; line c, plus 1 mM EGTA.

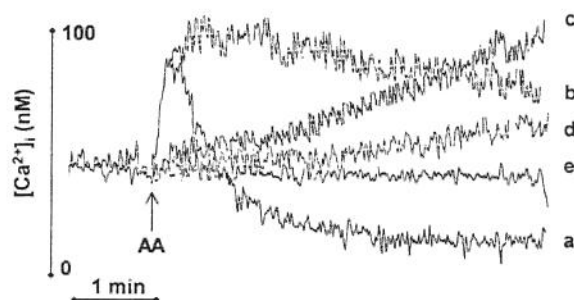


Fig. 6. Effect of different arachidonic acid concentrations on $[Ca^{2+}]_i$ in *T. brucei* procyclic trypomastigotes incubated in the absence of Ca^{2+} . Cells (5×10^7 ml $^{-1}$) were loaded with fura 2/AM, suspended in the same buffer described in Fig. 1, in the presence of 1 mM EGTA. Arachidonic acid (AA) at different concentrations (75, 50, 30, 20, 0 μ M, a–e, respectively) was added where indicated.

about 100 nM followed by a slow decrease to $\sim$ 70 nM during the 3-min incubation period. Lines c and d show that the addition of 30 and 20

μM arachidonic acid caused a slow increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from 50 to 100 nM, and from 50 to 60 nM, respectively. The control experiment, in the absence of arachidonic acid is shown in line e.

3.4. Arachidonic acid stimulates Ca^{2+} and acridine orange release from acidocalcisomes in permeabilized *T. brucei* procyclic

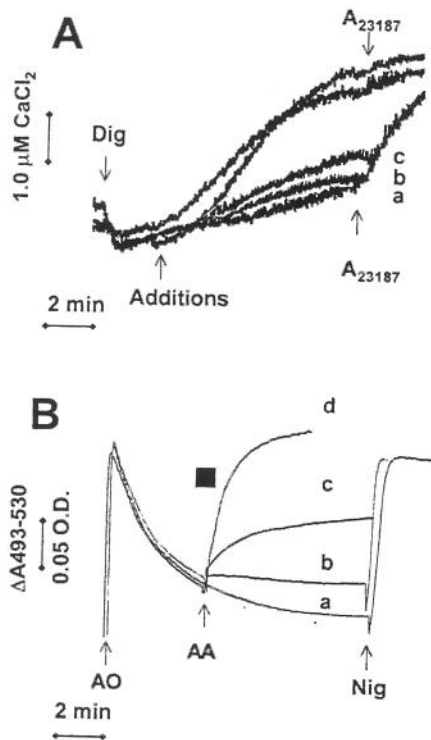


Fig. 7. Arachidonic acid stimulates Ca^{2+} and acridine orange release from acidocalcisomes in permeabilized *T. brucei* procyclic trypanomastigotes. Panel A, cells ($5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) were added to the standard reaction medium (125 mM sucrose, 65 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM potassium phosphate, 10 mM Hepes, pH 7.2) containing $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ oligomycin, $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ antimycin A, and $40 \mu\text{M}$ arsenazo III. Digitonin (Dig, $20 \mu\text{M}$), and A-23187 ($2.5 \mu\text{M}$) were added where indicated. Other additions: arachidonic acid (0, 10, 20, 50 μM , lines a, b, c, e, respectively) and nigericin ($1 \mu\text{M}$, line d) were done where shown. Panel B, cells ($5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) were added to the standard reaction medium containing 0.5 mM ATP, $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ oligomycin, $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ antimycin A and $20 \mu\text{M}$ digitonin. Acridine orange (AO, $3.0 \mu\text{M}$) was added where indicated (2 min after the cells). Arachidonic acid (AA) at different concentrations (0, 10, 20, 50 μM , a–d, respectively) and $1 \mu\text{M}$ nigericin were added where indicated.

The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by both melittin and arachidonic acid in *T. brucei* procyclics incubated in Ca^{2+} -free medium prompted us to investigate the effect of arachidonic acid on acidocalcisomes. In Fig. 7A digitonin-permeabilized cells were incubated in reaction medium containing antimycin A and oligomycin to prevent mitochondrial Ca^{2+} uptake. Line a shows a slow release of endogenous Ca^{2+} during the time of observation. This was followed by a fast Ca^{2+} release upon the addition of the Ca^{2+} ionophore A-23187. The addition of nigericin (line d) stimulated Ca^{2+} release demonstrating that most of the endogenous Ca^{2+} in these cells was stored in the acidocalcisomes in agreement with a previous report [11]. Lines b, c, e show that the addition of 10, 20 or 50 μM arachidonic acid, respectively, was followed by Ca^{2+} release, similar to that observed with nigericin, by a concentration-dependent mechanism. Fig. 7B shows that this release of Ca^{2+} is associated with an alkalinization of the acidocalcisomes, as illustrated by increase in acridine orange absorbance. Acridine orange is a tertiary amine that moves into the acidocalcisomes driven by $\Delta\Psi$ [12], a process which is accompanied by decrease in its absorbance as a consequence of its subsequent dimerization in acidic pH [40]. It can be observed that addition of acridine orange to a reaction medium containing permeabilized procyclics, ATP, antimycin A and oligomycin is followed by a significant accumulation of the dye by the acidocalcisomes, in agreement with previous observations [12]. It can be observed that similar to Ca^{2+} , acridine orange was released by nigericin or by the addition of 10–50 μM arachidonic acid.

3.5. Arachidonic acid can release Ca^{2+} from and decrease the membrane potential of *T. brucei* procyclic trypanomastigotes mitochondria in situ

T. brucei procyclics mitochondria are able to take up and retain Ca^{2+} in the presence of respiratory substrates [11]. Fig. 8A shows that when digitonin was added to permeabilize the plasma membrane of these cells in reaction medium containing 5 mM succinate and $10 \mu\text{M}$ free Ca^{2+} , a fast decrease in Ca^{2+} concentration occurred un-

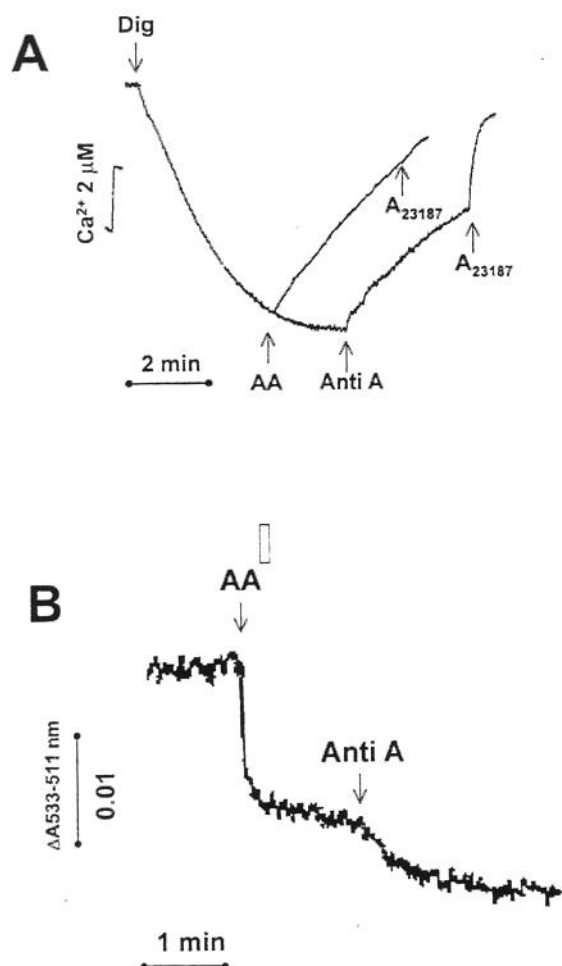


Fig. 8. Arachidonic acid-induced decrease in membrane potential and Ca^{2+} release from mitochondria in permeabilized *T. brucei* procyclic trypomastigotes. Panel A, Cells ($5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) were added to the standard reaction medium containing 10 μM CaCl_2 , 5 mM succinate, 1 mM sodium orthovanadate, and 40 μM arsenazo III, at 30°C. Digitonin (Dig, 20 μM), arachidonic acid (AA, 10 μM), antimycin A (Anti A, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and A-23187 (2.5 μM) were added where indicated. Panel B, cells ($5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) were added to the standard reaction medium containing 5 mM succinate, 0.25 mM EGTA, 10 μM safranin, and 20 μM digitonin at 30°C. Arachidonic acid (AA, 10 μM AA) and antimycin A (Anti A, 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were added where indicated.

til a steady-state was attained, in agreement with a previous report [11]. Ca^{2+} uptake by non-mitochondrial pools was prevented by the absence of exogenous ATP and presence of orthovanadate. The accumulated Ca^{2+} could be released either

by antimycin A or 10 μM arachidonic acid. In order to ascertain whether Ca^{2+} release from these mitochondria in situ could be due a decrease in their membrane potential, we investigated the effect of fatty acids on this parameter in digitonin-permeabilized *T. brucei* procyclics using the safranin O method. Fig. 8B shows that the addition of 10 μM arachidonic acid caused a large decrease in the absorbance of safranin at the wavelength pair 511–533 nm, compatible with depolarization of the inner mitochondrial membrane and return of safranin to the water phase. This decrease in membrane potential was completed by the addition of antimycin A (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$). This decrease in membrane potential induced by arachidonic acid is compatible with the protonophoric effect of long chain fatty acids as described by Schulachev [42].

4. Discussion

Previous studies from our laboratory [6–20,28–30,43–46] and other laboratories [38,47–56] have characterized the mechanisms involved in Ca^{2+} handling by mitochondrial and non-mitochondrial Ca^{2+} pools in various trypanosomatids. However, nothing was known regarding the regulation of Ca^{2+} entry across the plasma membrane of these cells until the recent report by Eintracht et al. [31] proposing that PLA_2 plays a pivotal role in the control of Ca^{2+} influx across the plasma membrane of *T. brucei* bloodstream trypomastigotes. These observations prompted us to analyse the effects of the peptide melittin and arachidonic acid in Ca^{2+} homeostasis in trypanosomes.

The experimental data presented here demonstrate that arachidonic acid can induce both Ca^{2+} entry in *T. brucei* procyclics, *L. donovani* promastigotes and *T. cruzi* amastigotes and Ca^{2+} release from the acidocalcisomes of *T. brucei* procyclics. Ca^{2+} mobilization from the acidocalcisomes was evaluated only in permeabilized *T. brucei* procyclics because these cells have a larger pool of releasable Ca^{2+} in the acidocalcisomes [11].

The influx of Ca^{2+} stimulated by melittin attains saturation at low concentrations (~ 400 – 500 nM), and is inhibited by the PLA_2 inhibitor OBAA, which by itself does not interfere with Ca^{2+} movements under our experimental conditions. This supports the notion that the peptide effect could indeed be mediated by a PLA_2 activation. This should also be the case when *T. brucei* procyclics were incubated in Ca^{2+} -free medium, a response that differs from that of all other trypanosomatids tested to date. Under these conditions Ca^{2+} may be released from intracellular compartments by the action of arachidonic acid generated endogenously. This response was not observed in *T. cruzi* amastigotes and *L. donovani* either because the amount of endogenous arachidonic acid generated by the action of melittin was not enough to stimulate Ca^{2+} release or the amount of releasable Ca^{2+} in the acidocalcisomes of these cells was very low.

The stimulation of Ca^{2+} entry by arachidonic acid was also concentration-dependent but except in the case of *T. cruzi* amastigotes which responded to $5 \mu\text{M}$ of this fatty acid (Fig. 4, panel B), *T. brucei* procyclics and *L. donovani* promastigotes only responded to doses higher than $10 \mu\text{M}$, a range in which other effects of this fatty acid on the membranes of acidocalcisomes and mitochondria could also be observed. The response of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to arachidonic acid was also observed in cells suspended in Ca^{2+} -free medium (Figs. 5 and 6) implying the involvement of Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores. To assess this possibility we monitored the effect of arachidonic acid on the acidocalcisomes and mitochondria in permeabilized *T. brucei* procyclics. The results show that arachidonic acid induces Ca^{2+} movements in these organelles in the same concentration range that stimulates Ca^{2+} entry into these cells. These results could explain the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observed when melittin was added to procyclic trypanomastigotes in Ca^{2+} -free medium (Fig. 1A, trace c). The transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by $75 \mu\text{M}$ arachidonic acid when the cells were suspended in Ca^{2+} free medium (Fig. 6, trace a) suggests that initially $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increased due to Ca^{2+} release from the acidocalcisomes (mitochondria in situ do not store appreciable

quantities of Ca^{2+} [11,44]) and then declined due to efflux through the plasma membrane in response to the concentration gradient generated by the presence of EGTA in the external medium. This inference implies that Ca^{2+} efflux across the plasma membrane is also facilitated by arachidonic acid raising some doubts regarding the mechanism(s) by which arachidonic acid cause Ca^{2+} mobilization at least at the higher concentrations used. The transition in the shape of the curves when arachidonic acid increased from 30 to $50 \mu\text{M}$ suggest that a different mechanism of transport may be triggered in this range of concentration. Similar results were observed with linoleic and linolenic acids in *T. brucei*, *Leishmania* and *T. cruzi* amastigotes (not shown).

Although the present data support the possibility of a signaling pathway involving an agonist-activated Ca^{2+} mobilization via PLA_2 -mediated generation of arachidonic acid in these parasites, they suggest that in the concentration range in which arachidonic acid stimulate Ca^{2+} mobilization in these cells, other mechanisms of transport may also be involved in addition to stimulation of plasma membrane-located calcium channels [31]. It is known that fatty acids facilitate H^+ transport across phospholipid bilayers [32] and mitochondrial membranes [42] in the concentration range in which they were used in this work. Indeed, the experiments of Fig. 8B illustrated that at a concentration of $10 \mu\text{M}$, arachidonic acid caused a significant decrease in mitochondrial membrane potential followed by Ca^{2+} release (Fig. 8A). In addition, Zeng et al. [33] demonstrated that fatty acids also induced transmembrane flux of Na^+ and K^+ via ionic association of the cation with the carboxylate anion of the fatty acid and the subsequent transmembrane flip-flop of the fatty acid–cation complex. Although this carrier type mechanism did not work with Mg^{2+} in phospholipid bilayers [33] the possibility of Ca^{2+} transport via this mechanism should be investigated in these cells.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the National Institutes of Health (AI-23259)

to R.D. S.A.U. was a postdoctoral fellow of the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). A.E.V. was a Biotechnology Career Fellow of the Rockefeller Foundation and was supported by the Brazilian agencies: Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal a Nível Superior (CAPES).

References

- [1] Anonymous. Tropical Disease Research, Thirteenth Programme Report, UNDP/World Bank/World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. World Health Organization, Geneva, 1997.
- [2] Benaim G. Intracellular calcium regulation and signaling in *Leishmania*. In: Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA, editors. Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. Landes Company, Austin, 1996, pp. 89–106.
- [3] Docampo R, Moreno SNJ. The role of Ca^{2+} in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol Today* 1996;12:61–5.
- [4] Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 1997;499:291–306.
- [5] Moreno SNJ, Silva J, Vercesi AE, Docampo R. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J Exp Med* 1994;180:1535–40.
- [6] Docampo R, Vercesi AE. Ca^{2+} transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria in situ. *J Biol Chem* 1989;264:108–11.
- [7] Docampo R, Vercesi AE. Characteristics of Ca^{2+} transport by *Trypanosoma cruzi* mitochondria in situ. *Arch Biochem Biophys* 1989;272:122–9.
- [8] Vercesi AE, Hoffmann ME, Bernardes CF, Docampo R. Regulation of intracellular calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. Effects of calmidazolium and trifluoperazine. *Cell Calcium* 1991;12:361–9.
- [9] Vercesi AE, Bernardes CF, Hoffmann ME, Gadelha FR, Docampo R. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J Biol Chem* 1991;266:14431–4.
- [10] Vercesi AE, Docampo R. Ca^{2+} transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca^{2+} , pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem J* 1992;284:463–7.
- [11] Moreno SNJ, Docampo R, Vercesi AE. Calcium homeostasis in procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Lack of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} release. *J Biol Chem* 1992;267:6020–6.
- [12] Vercesi AE, Moreno SNJ, Docampo R. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 1994;304:227–33.
- [13] Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SNJ. Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1995;310:1005–12.
- [14] Lu HG, Zhong L, Chang KP, Docampo R. Intracellular Ca^{2+} pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Biol Chem* 1997;272:9464–73.
- [15] Scott DA, Docampo R, Dvorak JA, Shi S, Leapman RD. In situ compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1997;272:28020–929.
- [16] Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SNJ, Docampo R. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1998;273:22151–8.
- [17] Vercesi AE, Docampo R. Sodium-proton exchange stimulates Ca^{2+} release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 1996;315:265–70.
- [18] Vercesi AE, Grijalba M, Docampo R. Inhibition of Ca^{2+} release from *Trypanosoma brucei* acidocalcisomes by 3,5-dibutyl-4-hydroxytoluene: role of the $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ exchanger. *Biochem J* 1997;328:479–82.
- [19] Rodrigues CO, Scott DA, Docampo R. Presence of a vacuolar H^{+} -pyrophosphatase in promastigotes of *Leishmania donovani* and its localization to a different compartment from the vacuolar H^{+} -ATPase. *Biochem J* 1999;340:759–66.
- [20] Rodrigues CO, Scott DA, Docampo R. Characterization of a vacuolar pyrophosphatase in *Trypanosoma brucei* and its localization to acidocalcisomes. *Mol Cell Biol* 1999;19:7712–23.
- [21] Berridge MJ. Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1987;56:159–93.
- [22] Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984;308:693–8.
- [23] Montero M, Alvarez J, Garcia Sancho J. Agonist-induced Ca^{2+} influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular calcium stores. *Biochem J* 1991;277:73–9.
- [24] Geiszt M, Kaldi K, Szeberenyi JB, Ligeti E. Thapsigargin inhibits Ca^{2+} entry into human neutrophil granulocytes. *Biochem J* 1995;305:525–8.
- [25] Putney JW. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 1990;11:611–24.
- [26] Shuttleworth TJ, Thompson JL. Muscarinic receptor activation of arachidonate-mediated Ca^{2+} entry in HEK293 cells is independent of phospholipase C. *J Biol Chem* 1998;273:32636–43.

- [27] Shuttleworth TJ. Arachidonic acid activates the noncapacitative entry of Ca^{2+} during $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations. *J Biol Chem* 1996;271:21720–5.
- [28] Docampo R, Pignataro OP. The inositol phosphate/diacylglycerol signalling pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1991;275:407–11.
- [29] Moreno SNJ, Vercesi AE, Pignataro OP, Docampo R. Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes: presence of inositol phosphates and lack of an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium pool. *Mol Biochem Parasitol* 1992;52:251–256.
- [30] Docampo R, Moreno SNJ, Vercesi AE. Effect of thapsigargin on calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1993;59:305–14.
- [31] Eintracht J, Maathai R, Mellors A, Ruben L. Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A_2 and arachidonic acid. *Biochem J* 1998;336:659–66.
- [32] Gutknecht J. Proton conductance caused by long-chain fatty acids in phospholipid bilayer membranes. *J Membr Biol* 1988;106:83–93.
- [33] Zeng Y, Han X, Schlesinger P, Gross RW. Nonesterified fatty acids induce transmembrane monovalent cation flux: host–guest interactions as determinants of fatty acid-induced ion transport. *Biochemistry* 1998;37:9497–503.
- [34] Brun R, Schönenberg M. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Trop* 1979;36:289–92.
- [35] Schmatz DM, Murray PK. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in irradiated muscle cells: improved synchronization and enhanced trypomastigote production. *Parasitology* 1982;85:115–25.
- [36] Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949;177:751–66.
- [37] Scarpa A. Measurements of cation transport with metalochromic indicators. *Methods Enzymol* 1979;56:301–38.
- [38] Philosoph H, Zilberstein D. Regulation of intracellular calcium in promastigotes of the human protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 1989;264:10420–4.
- [39] Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440–50.
- [40] Palmgren MG. Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanisms and limitations. *Anal Biochem* 1991;192:316–21.
- [41] Åkerman KEO, Wikström KF. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 1976;68:191–7.
- [42] Schulachev VP. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 1991;294:158–62.
- [43] Vercesi AE, Docampo R, Moreno SNJ. Energization-dependent Ca^{2+} accumulation in *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic trypomastigotes mitochondria. *Mol Biochem Parasitol* 1992;56:251–7.
- [44] Vercesi AE, Moreno SNJ, Bernardes CF, Meinicke AR, Fernandes EC, Docampo R. Thapsigargin causes Ca^{2+} release and collapse of the membrane potential of *Trypanosoma brucei* mitochondria in situ and of isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1993;268:8564–8.
- [45] Scott DA, Moreno SNJ, Docampo R. Ca^{2+} storage in *Trypanosoma brucei*: the influence of cytoplasmic pH and importance of vacuolar acidity. *Biochem J* 1995;310:780–94.
- [46] Lu HG, Zhong L, de Souza W, Benchimol M, Moreno SNJ, Docampo R. Ca^{2+} content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Cell Biol* 1998;18:2309–23023.
- [47] Benaim G, Bermudes R, Urbina JA. Ca^{2+} transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1990;39:61–8.
- [48] Ruben L, Hutchinson A, Moehlman J. Calcium homeostasis in *Trypanosoma brucei*. Identification of a pH-sensitive non-mitochondrial calcium pool. *J Biol Chem* 1991;266:24351–8.
- [49] Ruben L, Akins CD. *Trypanosoma brucei*: the tumor promoter thapsigargin stimulates calcium release from an intracellular compartment in slender bloodstream forms. *Exp Parasitol* 1992;74:332–9.
- [50] Oz H, Wittner M, Tanowitz HB, Bilezikian JP, Saxon M, Morris SA. *Trypanosoma brucei*: the tumor promoter thapsigargin stimulates calcium release from an intracellular compartment in slender bloodstream forms. *Exp Parasitol* 1992;74:390–9.
- [51] Ruben L, Akins CD, Haghighat NG, Xue L. Calcium influx in *Trypanosoma brucei* can be induced by amphiphilic peptides and amines. *Mol Biochem Parasitol* 1996;81:191–200.
- [52] Xiong ZH, Ruben L. Nuclear calcium flux in *Trypanosoma brucei* can be quantified with targeted aequorin. *Mol Biochem Parasitol* 1996;83:57–67.
- [53] Stojdl DF, Clarke MW. *Trypanosoma brucei*: analysis of cytoplasmic Ca^{2+} during differentiation of bloodstream stages in vitro. *Exp Parasitol* 1996;83:134–46.
- [54] Xiong ZH, Ridgley EL, Enis D, Olness F, Ruben L. Selective transfer of calcium from an acidic compartment to the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. Measurements with targeted aequorins. *J Biol Chem* 1997;272:31022–8.
- [55] Xiong ZH, Ruben L. *Trypanosoma brucei*: the dynamics of calcium movement between the cytosol, nucleus, and mitochondrion of intact cells. *Exp Parasitol* 1998;88:231–9.
- [56] Zhang HS, McDonald TV, Tanowitz HB, Wittner M, Weiss LM, Bilezikian JP, Morris SA. Intracellular Ca^{2+} homeostasis in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol* 1998;45:80–6.

4.2.4 Discussão do 2º trabalho

Em estudos anteriores, nosso laboratório (DOCAMPO & VERCESI, 1989A, 1989B; VERCESI *et al.*, 1991 A, 1991B, 1992, 1993A, 1993B, 1994B, 1997B; DOCAMPO & PIGNATARO, 1991; VERCESI & DOCAMPO, 1992, 1996; MORENO *et al.*, 1992A, 1992 B; DOCAMPO *et al.*, 1993, 1995; SCOTT *et al.*, 1995; LU *et al.*, 1997, 1998; SCOTT *et al.*, 1997, 1998; RODRIGUES *et al.*, 1999) e outros (PHILOSOPH & ZILBERSTEIN, 1989; BENAÏM *et al.*, 1990; RUBEN *et al.*, 1991, 1996; RUBEN & AKINS, 1992; OZ *et al.*, 1992; XIONG & RUBEN, 1996, 1998; STOJDL & CLARKE, 1996; XIONG *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 1998) caracterizaram mecanismos de transporte de Ca^{2+} nos reservatórios intracelulares de Ca^{2+} mitocondriais e não-mitocondriais em vários tripanossomatídeos. Entretanto, nada era conhecido no que se refere à regulação de entrada de Ca^{2+} através da membrana plasmática nessas células até que um trabalho recente de Eintracht *et al.* (EINTRACHT *et al.*, 1998), propôs que a PLA_2 tem um papel importante no controle do influxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. brucei*. Essas observações levaram-nos a analisar os efeitos do peptídeo melitina e vários ácidos graxos insaturados e saturados sobre a homeostase de Ca^{2+} em tripanossomas. Seus efeitos sobre os gradientes de Ca^{2+} e H^+ em acidocalcisomas e membrana interna mitocondrial também foram estudados.

Os resultados experimentais apresentados aqui demonstram que ácidos graxos podem induzir entrada de Ca^{2+} em formas tripomastigotas procíclicas de *T. brucei*, promastigotas de *L. donovani* e amastigotas de *T. cruzi* e liberação de Ca^{2+} da mitocôndria e acidocalcisomas de formas tripomastigotas procíclicas de *T. brucei*. A mobilização de Ca^{2+} de reservatórios intracelulares foi evidenciada somente em formas procíclicas de *T. brucei* permeabilizadas, porque essas células têm maior conteúdo de Ca^{2+} nos acidocalcisomas (MORENO *et al.*, 1992A) e são capazes de sustentar um potencial de membrana mitocondrial mais estável. Além disso, a mitocôndria pode reter Ca^{2+} acumulado durante os

experimentos melhor que promastigotas de *L. donovani* e amastigotas de *T. cruzi* (resultados não mostrados).

O influxo de Ca^{2+} estimulado pela melitina atinge saturação a baixas concentrações (em torno de 400-500 nM), e é inibido pelo inibidor de PLA_2 , OBAA, o qual, por si só, não interfere com os movimentos de Ca^{2+} , sob nossas condições experimentais. Isso reforça a noção de que o efeito do peptídeo é, sem dúvida, mediado pela ativação da PLA_2 . Esse efeito pode ser verificado também quando formas procíclicas de *T. brucei* foram incubadas em meio livre de Ca^{2+} . Sob essas condições o Ca^{2+} pode ser liberado de compartimentos intracelulares pela ação do ácido araquidônico gerado internamente.

O estímulo da entrada de Ca^{2+} pelo ácido araquidônico foi também observado de maneira dependente da concentração. Com exceção de formas amastigotas de *T. cruzi*, que responderam a 5 μM deste ácido graxo (Fig. 4, painel B), formas procíclicas de *T. brucei* e promastigotas de *L. donovani* somente responderam a doses maiores que 10 μM . A resposta da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pelo ácido araquidônico foi também observada em células suspensas em meio livre de Ca^{2+} (Figs. 5 e 6) indicando liberação de Ca^{2+} de reservatórios intracelulares. Para verificar esta possibilidade, monitorou-se o efeito de ácidos graxos nos gradientes de Ca^{2+} e H^+ através da membrana interna mitocondrial e acidocalcisomas de formas procíclicas de *T. brucei* permeabilizados. Os resultados mostraram que ácidos graxos induzem movimentos de Ca^{2+} e H^+ em ambas organelas, na mesma faixa de concentração daquela que estimula a entrada de Ca^{2+} nessas células. Estes resultados podem explicar porque os reservatórios intracelulares de Ca^{2+} não contribuem para o retorno da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ao nível basal após o influxo através da membrana plasmática ser estimulada pelos ácidos graxos. Eles podem também explicar o aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado quando melitina é adicionada às procíclicas tripomastigotas em meio livre de Ca^{2+} (Fig. 1A, linha c). O aumento transiente na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzido por ácido araquidônico 75 μM quando as células foram suspensas em meio livre de Ca^{2+} (Fig. 6, linha a), sugere que o aumento inicial na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi devido à saída de Ca^{2+} de acidocalcisomas (mitocôndrias *in situ* não contêm quantidades

apreciáveis de Ca^{2+} , MORENO *et al*, 1992A, Vercesi *et al*, 1993B), e então foi diminuído devido ao efluxo através da membrana plasmática em resposta ao gradiente de concentração gerado pela presença de EGTA no meio externo. Essa inferência implica em que o efluxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática é também facilitada pelo ácido araquidônico, deixando algumas dúvidas no que diz respeito ao(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) eles causam mobilização de Ca^{2+} .

Os resultados aqui apresentados sugerem a possibilidade de participação de ácido araquidônico como agonista de Ca^{2+} num mecanismo mediado pela PLA_2 nestes parasitas. Todavia eles sugerem também que na faixa de concentração no qual os ácidos graxos estimulam a mobilização de Ca^{2+} nestas células, outros mecanismos de transporte podem estar envolvidos além daqueles que estimulam canais de cálcio localizados na membrana plasmática (EINTRACHT *et al*, 1998). É conhecido que ácidos graxos facilitam o transporte de H^+ através de membranas biológicas, na mesma faixa de concentração que foi utilizada neste trabalho (GUTKNECHT, 1988). Além disso, Zeng e colaboradores (ZENG *et al*, 1998) demonstraram que ácidos graxos podem induzir o fluxo transmembrana de Na^+ e K^+ via associação iônica do cátion com o ânion carboxilado do ácido graxo e subsequente flip-flop transmembrana do complexo ácido graxo-cátion. Apesar deste tipo de mecanismo de transporte não ocorrer com Mg^{2+} em bicamadas de fosfolípidos (ZENG *et al*, 1998), a possibilidade de transporte de Ca^{2+} por esse mecanismo deve ser investigada nestas células.

Finalmente, podemos concluir que a PLA_2 está presente em tripanossomas e que apresenta um potencial papel como agonista da entrada de Ca^{2+} nestas células. Enquanto os resultados obtidos com melitina sugerem essa proposição, os resultados obtidos com ácidos graxos indicam que muito cuidado deve ser tomado na interpretação dos resultados: efeitos não específicos de ácidos graxos na permeabilidade de membrana e suas capacidades de atuarem como carreadores móveis de cátions através de membranas biológicas devem ser considerados.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Nos trabalhos apresentados nessa tese, pudemos demonstrar que, na presença de cálcio, AA induz a abertura do PTP. Um modelo esquemático do mecanismo pelo qual ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial interna e a abertura do PTP está apresentado na Fig. 8. Nossos experimentos, elaborados com mitocôndrias de fígado de rato, incubadas na presença de Ca^{2+} , sugerem que AA induz um desacoplamento, mediado por sua ação protonofórica, aumentando a velocidade da respiração, que estimula a oxidação do NAD(P)H, tendo como consequência, a produção e o acúmulo de EROs, que podem oxidar tióis de proteínas. Essa condição de estresse oxidativo gerado pela falta de equivalentes redutores do NAD(P)H, para o sistema antioxidante glutathione redutase/glutathione peroxidase favorece a abertura do PTP, devido ao ataque de EROs a grupamentos -SH.

Nos trabalhos com células intactas, pudemos demonstrar que AA pode induzir a entrada de Ca^{2+} através da membrana plasmática, em formas tripomastigotas procíclicas de *T. brucei*, promastigotas de *L. donovani* e amastigotas de *T. cruzi*, e, liberar Ca^{2+} da mitocôndria e acidocalcisomas, de formas tripomastigotas procíclicas de *T. brucei*.

Propomos, nesta tese, um esquema geral sintetizado na Fig. 9, para explicar os efeitos de AA em tripanossomatídeos. Em suma, podemos dizer que o ácido araquidônico pode ser biossintetizado em resposta a estímulos, que interagem com receptores da membrana plasmática, que estão acoplados às proteínas regulatórias ligadas à proteína G. Isto resulta ou em ativação direta de PLA_2 (EINTRACHT *et al*, 1998), ou de PLC (presentes em *T. brucei*, DOCAMPO & PIGNATARO, 1991; FURUYA *et al*, 2000) ou de PLD (não demonstrado nesses parasitas). Este aumento de AA elevaria a concentração citosólica de cálcio, através do estímulo do influxo pela membrana plasmática e liberação de compartimentos intracelulares. O IP_3 pode liberar cálcio do retículo endoplasmático. A presença de AA, no citosol, induz a liberação de Ca^{2+} pela mitocôndria e pelo acidocalcisoma.

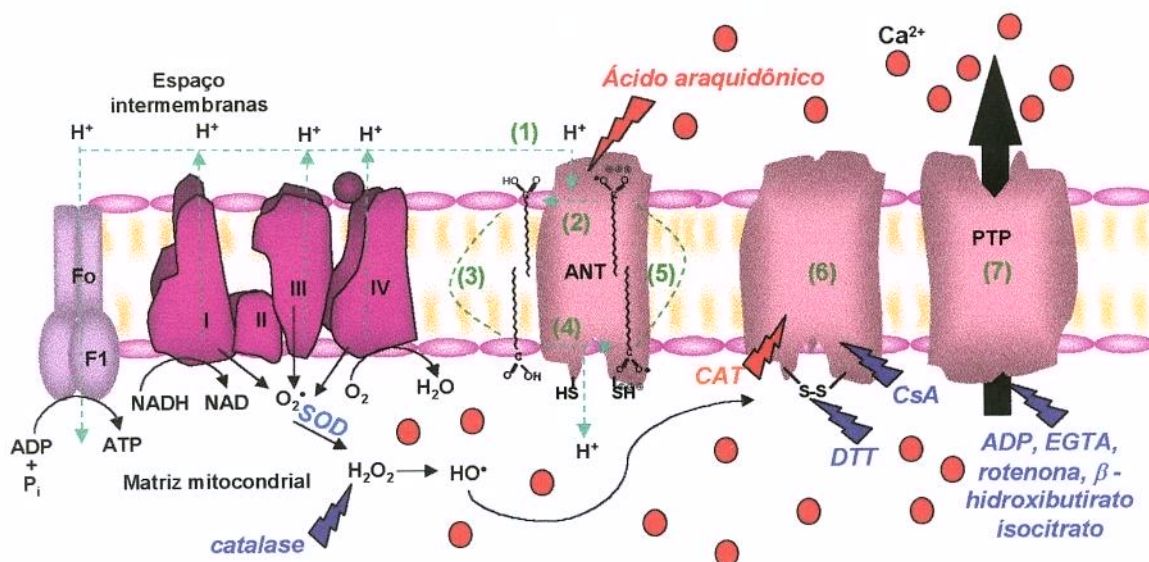


Fig. 8 Mecanismo de abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) por ácido graxo. (1) Prótons (H^+) ejetados pela cadeia respiratória, da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, se ligam a ânions de ácidos graxos; (2) Ácido graxo protonado na superfície externa da membrana mitocondrial interna; (3) Ácido graxo protonado atravessa a bicamada fosfolipídica da membrana (flip-flop); (4) Ácido graxo é desprotonado na superfície interna da membrana interna, deixando um H^+ na matriz mitocondrial. Este processo diminui o $\Delta\psi$ e estimula a respiração, levando a maior oxidação de NAD(P)H. (5) Ânion de ácido graxo formado, impermeável à bicamada, é translocado pelo ANT, pronto para ser novamente protonado; (6) A oxidação de grupos tióis do ANT, com mudança de sua conformação, favorece a formação do PTP (7).

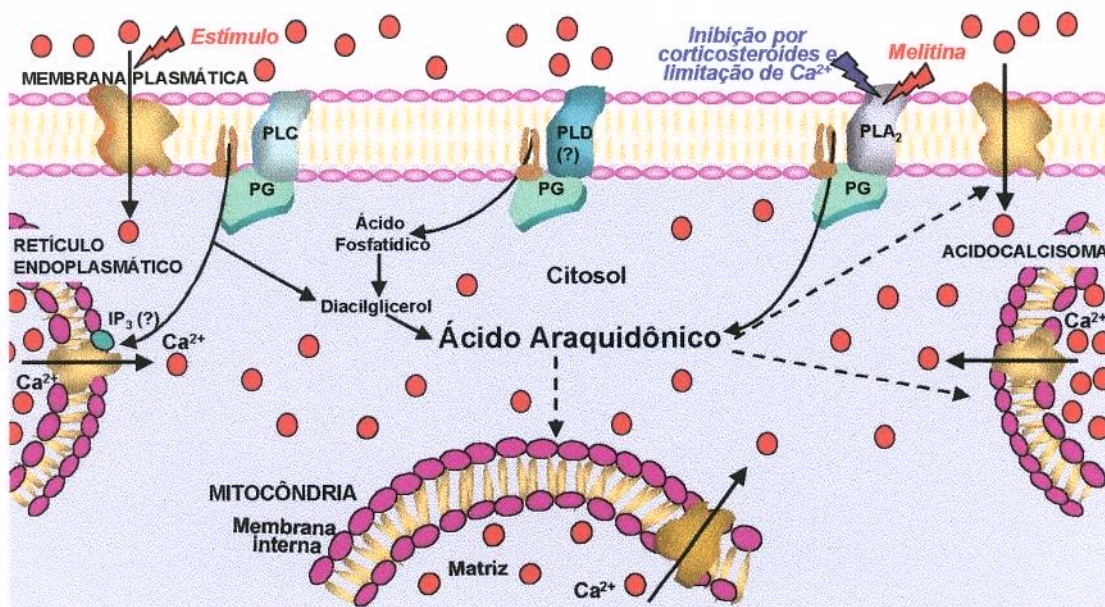


Fig. 9 Esquema resumando efeitos de ácido araquidônico, na membrana plasmática e nas organelas intracelulares de tripanossomatídeos. Receptores da membrana plasmática, acoplados às proteínas regulatórias ligadas à proteína G (PG), podem ser estimulados, aumentando o influxo de cálcio, ativando as fosfolipases C, D e A₂ (PLC, PLD, PLA₂), liberando ácido araquidônico. Este aumento de AA elevaria a concentração citosólica de cálcio, através do estímulo do influxo pela membrana plasmática e pela liberação das organelas intracelulares, mitocôndria e acidocalcisoma.

6. SUMMARY

Calcium ions play essential role in the control of many cellular functions, however the excess may act as a trigger for both programmed (apoptosis) or accidental cell death (necrosis). To evaluate the role of arachidonic acid (AA) in intracellular calcium homeostases, we used two experimental models: isolated rat liver mitochondria and trypanosomatids. We have compared the PTP opening ability of AA with that of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (FCCP) at concentrations that cause similar quantitative dissipation of the membrane potential ($\Delta\Psi$) in Ca^{2+} -loaded rat liver mitochondria respiring on succinate. The protonophoric effects of AA and FCCP were only slightly modified by carboxyatractyloside and were followed by PTP opening, sensitive to catalase, EGTA, ADP, dithiothreitol, cyclosporin A, rotenone or NAD(P)H-linked substrates. These results indicate that a condition of oxidative stress associated with the oxidized state of PN underlies membrane protein thiol oxidation and PTP opening.

We also studied the AA induced-calcium mobilization in *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes, *Leishmania donovani* promastigotes and *Trypanosoma cruzi* amastigotes. We verified that Ca^{2+} influx was also stimulated in a dose-dependent manner (50–400 nM) by the amphiphilic peptide melittin. This effect was blocked by the phospholipase A_2 inhibitor 3-(4-octadecyl)-benzoylacrylic acid. The unsaturated fatty acid AA, in the range of 10–75 μM , induced Ca^{2+} entry by a mechanism sensitive to LaCl_3 . However, both melittin and AA induced increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in *T. brucei* procyclic trypomastigotes incubated in Ca^{2+} -free medium implying Ca^{2+} mobilization from intracellular stores. This hypothesis was supported by experiments showing that AA promoted Ca^{2+} release from the acidocalcisomes of these cells. The results showing changes in mitochondrial membrane potential, release of acridine orange and Ca^{2+} from the acidocalcisomes and Ca^{2+} release across the plasma membrane suggest that in addition to the stimulation of a Ca^{2+} channel mediated process, AA, in the range of concentrations used here, have other nonspecific effects on the trypanosomatids membranes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅKERMAN, K.E.O. & NICHOLLS, D.G. (1983) Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **95**: 149-201.
- ÅKERMAN, K.E.O. & WIKSTROM, M.K.F. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potencial. *FEBS Lett.* **68**: 191-197.
- ÅKERMAN, K.E.O. (1978) Effect of pH and Ca^{2+} on the retention of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **189**: 256-262.
- ANTONIO, R.V., PEREIRA-DA-SILVA, L., VERCESI, A.E. (1991) Alterations in mitochondrial Ca^{2+} flux by the antibiotic X537A (lasalocid A). *Biochem. Biophys. Acta* **1056**: 250-258.
- BALES, J.D. & HARRISON, S.M. (1994) African trypanosomiasis. In *Infectious Diseases*. 5th ed., J.B. Lippincott Company, PH, p. 1214-1218.
- BEATRICE, M.C., STIERS, D.L., PFEIFFER, D.R. (1984) The role of glutathione in the retention of Ca^{2+} by liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **259**: 1279-1287.
- BECHARA, E.J.H., FARIA-OLIVEIRA, O.M.M., DURÁN, N., BATISTA, R.C., CILENTO, G. (1979) Peroxidase catalized generation of triplet acetone. *Photochem. Photobiol.* **30**: 101-110.
- BELLOMO, G., JEWELL, S.A., THOR, H., ORRENIUS, S. (1982) Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and *t*-butyl hydroperoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6842-6846.
- BENAIM, G. (1996) Intracellular calcium regulation and signaling in *Leishmania*. In Tapia, FJ, Cáceres-Dittmar, G, Sánchez, MA, editors. *Molecular and*

Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. Landes Company, 89-106.

- BENAIM, G., BERMUDEZ, R., URBINA, J.A. (1990) Ca^{2+} transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 61-68.
- BERMAN, J.D. (1997) Human Leishmaniasis: Clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Diseases* **24**: 684-703.
- BERNARDES, C.F., MEYER-FERNANDES, J.R., BASSERES, D.S., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. (1994) Permeabilization of rat liver inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) in the presence of Ca^{2+} is mediated by production of membrane protein aggregates. *Biochim. Biophys. Acta.* **1188**: 93-100.
- BERNARDES, C.F., PEREIRA DA SILVA, L., VERCESI, A.E. (1986) *t*-Butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg^{2+} and ATP. *Biochim. Biophys. Acta* **850**: 41-48.
- BERNARDI, P. & PETRONILLI, V. (1996) The permeability transition pore as a mitochondrial calcium: a critical appraisal. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**: 131-138.
- BERNARDI, P. (1992) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. *J. Biol. Chem.* **267**: 8334-8339.
- BERNARDI, P., BROEKEMEIER, K.M., PFEIFFER, D.R. (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 509-517.

- BERNARDI, P., VASSANELLI, S., VERONESE, P., COLONNA, R. SZABÒ, I., ZORATTI, M. (1992) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **267**: 2934-2939.
- BERNARDI, P., VERONESE, P., PETRONILLI, V. (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me^{2+} binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J. Biol. Chem.* **268**: 1005-1010.
- BERRIDGE, M.J. (1987) Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 159-193.
- BERRIDGE, M.J. (1997) Elementary and global aspects of calcium of calcium signalling. *J. Physiol.* **499**: 291-306.
- BIEMOND, P., VAN EIJK, H.G., SWAAK, A.J.G., KOSTER, J.F. (1984) Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* **73**: 1576-1579.
- BOVERIS, A., OSHINO, N., CHANCE, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **128**: 617-630.
- BRAND, M.D. (1985A) Electroneutral efflux of Ca^{2+} from liver mitochondria. *Biochem. J.* **225**: 413-419.
- BRAND, M.D. (1985B) The stoichiometry of the exchange catalyzed by the mitochondrial calcium/sodium antiporter. *Biochem. J.* **229**: 161-166.
- BRAY, R.S. (1974) *Leishmania*. *Ann. Rev. Microbiol.* **28**: 189-217.
- BRINLEY, F.J., TIFFERT, J.T., MULLINS, L.J., SCARPA, A. (1977) Kinetic measurement of Ca^{2+} transport by mitochondria in situ. *FEBS Lett.* **82**: 197-200.

- BRINLEY, F.J., TIFFERT, T., SCARPA, A. (1978) Kinetics of calcium accumulation by mitochondria, studied *in situ*, in squid giant axons. *FEBS Lett.* **91**: 25-29.
- BROEKEMEIER, K.M., DEMPSEY, M.E., PFEIFFER, D.R. (1989) Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **264**: 7826-7830.
- BRUN, R. & SCHÖNENBERG, M. (1979) Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Trop.* **36**: 289-292.
- BRUSTOVETSKY, N.N., EGOROVA, M.V., GNUTON, D. YU. (1993) The mechanism of calcium-dependent activation of respiration of liver mitochondria from hibernating ground squirrels, *Citellus undulatus*. *Comp.Biochem.Physiol.* **106** (B): 423-426.
- BYGRAVE, F.L. (1977) Mitochondrial calcium transport. *Curr.Top.Bioenerg.* **6**: 259-318.
- CADENAS, E. & BOVERIS, A. (1980) Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem. J.* **188**: 31-37.
- CADENAS, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 79-110.
- CADENAS, E., BOVERIS, A., RAGAN, C.I., STOPPANI, A.O.M. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **180**: 248-257.
- CAO, Y., PEARMAN, T., ZIMMERMAN, G.A., MCINTYRE, T.M., PRESCOTT, S.M. (2000) Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc. Natl.Acad. Sci.* **97**: 11280-11285.

- CARAFOLI, E. & CROMPTON, M. (1978) The regulation of intracellular calcium. *Curr. Top. Membr. Trans.* **10**: 151-156.
- CARAFOLI, E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 395-433.
- CARAFOLI, E. (1989) The plasma membrane calcium pump. In: *Cell Calcium Metabolism*. (Fiskum, S.Ed.) Olenum Press, New Press, New York and London, 21-26.
- CARAFOLI, E. (1994) Biogenesis plasma membrane calcium ATPase 15 year of work on the purified enzyme. *FASEB J.* **8**: 993-1002.
- CARBONERA, D., ANGRILLI, A., AZZONE, G.F. (1988) Mechanism of nitrofurantoin toxicity and oxidative stress in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **936**: 139-147.
- CARNIERI, E.G.S., MARTINS, I.S., VERCESI, A.E. (1987) The mechanism and biological role of calcium transport by plant mitochondria. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **20**: 635-638.
- CASTILHO, R.F., KOWALTOWSKI, A.J., MEINICKE, A.R., BECHARA, E.J.H., VERCESI, A.E. (1995A) Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radical Biol. Med.* **18**: 479-486.
- CASTILHO, R.F., KOWALTOWSKI, A.J., MEINICKE, A.R., VERCESI, A.E. (1995B) Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or *t*-butyl hydroperoxide in the presence of Ca^{2+} : effect of coenzyme Q redox state. *Free Radical Biol. Med.* **18**: 55-59.
- CASTILHO, R.F., KOWALTOWSKI, A.J., VERCESI, A.E. (1996) The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus

- prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**: 523-529.
- CASTILHO, R.F., MEINICKE, A.R., ALMEIDA, A.M., HERMES-LIMA, M., VERCESI, A.E. (1994) Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate is potentiated by Ca^{2+} and includes lipid peroxidation and alterations in membrane proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**: 158-163.
- CHAVES, E., ZAZUETA, C., GARCIA, N. (1999) Carboxyatractyloside increases the effect of oleate on mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* **445**: 189-191.
- CLARK, A. & CARAFOLI, E. (1983) The stoichiometry of the Ca^{2+} pumping ATPase of erythrocytes. *Cell. Calcium* **4**: 83-88.
- COCCO, T., DI PAOLA, M., PAPA, S., LORUSSO, M. (1999) Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation *Free Rad. Biol. Med.* **27**: 51-59.
- COLL, K.E., JOSEPH, S.K., CORKEY, B.E., WILLIAMSON, J.R. (1982) Determination of the matrix free Ca^{2+} concentration and kinetics of Ca^{2+} efflux in liver and heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**: 8696-8704.
- CONNOR, R.J. (1994) African animal trypanosomiasis. In: *Infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa*, Oxford University Press, NY, v.1, p. 167-205.
- CROMPTON, M., CAPANO, M., CARAFOLI, E. (1976) The sodium induced efflux of calcium from heart mitochondria. A possible mechanism for the regulation of mitochondrial calcium. *Eur. J. Biochem.* **69**: 453-462.
- CROMPTON, M., ELLINGER, H., COSTI, A. (1988) Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**: 357-360.

- DE MEIS, L. & VIANNA, A.L. (1979) Energy interconversion by the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 275-292.
- DE VALCK, D., VERCAMMEN, D., FIERIS, W., BEYAERT, R. (1998) Differential activation of phospholipases during necrosis or apoptosis: a comparative study using tumor necrosis factor and anti-Fas antibodies. *J. Cell. Biochem.* **71**: 392-399.
- DENTON, R.M., RICHARDS, D.A., CHIN, J.G. (1978) Calcium ions and regulation of the NAD^{+} -linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem. J.* **176**: 899-906.
- DI MASCIO, P., CATALANI, L.H., BECHARA, E.J.H. (1992) Are dioxetanes chemiluminescent intermediates in lipoperoxidation? *Free Radical Biol. Med.* **12**: 471-478.
- DOCAMPO, R. & MORENO, S.N.J. (1996) The role of Ca^{2+} in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol. Today* **12**: 61-65.
- DOCAMPO, R. & PIGNATARO, O.P. (1991) The inositol phosphate/diacylglycerol signalling pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **275**: 407-411.
- DOCAMPO, R. & VERCESI, A.E. (1989A) Characteristics of Ca^{2+} transport by *Trypanosoma cruzi* mitochondria "in situ". *Arch. Biochem. Biophys.* **272**: 122-129.
- DOCAMPO, R. & VERCESI, A.E. (1989B) Ca^{2+} transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria "in situ". *J. Biol. Chem.* **264**: 108-111.
- DOCAMPO, R., MORENO, S.N.J., VERCESI, A.E. (1993) Effect of thapsigargin on calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**: 305-314.

- DOCAMPO, R., SCOTT, D. A., VERCESI, A. E., MORENO, S. N. J. (1995) Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **310**: 1005-1012.
- DUNFORD, H.B. (1987) Free radicals is iron-containing system. *Free Radical Biol. Med.* **3**: 405-421.
- EINTRACHT, J., MAATHAI, R., MELLORS, A., RUBEN, L. (1998) Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A_2 and arachidonic acid. *Biochem. J.* **336**: 659-666.
- ENGLAND, P.J. (1986) Intracellular calcium receptor mechanisms. *Brit. Med. Bull.* **42**: 375-383.
- FAGIAN, M.M.; PEREIRA DA SILVA, L.; MARTINS, I.S., VERCESI, A.E. (1990) Membrane protein thiol cross-linking associated by Ca^{2+} plus prooxidants. *J. Biol. Chem.* **265**: 19955-19960.
- FARBER, J.L. (1981) The role of calcium in cell death. *Life Sci.* **29**: 1289-1295.
- FISKUM, G. & LEHNINGER, A.L. (1979) Regulated release of Ca^{2+} from respiring mitochondria by $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ antiport. *J. Biol. Chem.* **254**: 6236-6239.
- FREIRE-DE-LIMA, C.G., NASCIMENTO, D.O., SOARES, M.B.P., BOZZA, P.T., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., MELLO, F.G., DOSREIS, G.A., LOPES, M.F. (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* **403**: 199-203.
- FURUYA, T., KASHUBA, C., DOCAMPO, R., MORENO, S.N.J. (2000) A novel phosphatidylinositol-phospholipase C of *Trypanosoma cruzi* that is lipid modified and activated during trypomastigote to amastigote differentiation. *J. Biol. Chem.* **275**: 6428-6438.
- GARLID, K.D. (1994) Mitochondrial cation transport: a progress report. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 537-542.

- GEISZT, M., KALDI, K., SZEBERENYI, J.B., LIGETI, E. (1995) Thapsigargin inhibits Ca^{2+} entry into human neutrophil granulocytes. *Biochem. J.* **305**: 525-528.
- GOODMAN & GILMAN'S (1996) The pharmacological basis of therapeutics, 9^o edit. McGraw Hill - Health Professions Division. New York.
- GORNALL, A.G.; BARDWILL, C.J., DAVID, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**: 751.
- GREEN, D.R. & REED, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312.
- GRIFFITHS, E. & HALESTRAP, A.P. (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* **307**: 93-98.
- GRIJALBA, M.T., VERCESI, A.E., SCHREIER, S. (1999) Ca^{2+} -induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{2+} -stimulated generation of reactive oxygen species by respiratory chain. *Biochemistry* **38**: 13279-13287.
- GRIMALDI, G. & MCMAHON-PRATT, D. (1991) Leishmaniasis and its etiologic agents in the new world: an overview. *Prog. Clin. Parasitol.* **2**: 73-118.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., TSIEN, R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450.
- GUNTER, T.E. & PFEIFFER, D.R. (1990) Mechanism by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* **258**: C755-C786.
- GUNTER, T.E., GUNTER, K.K., SHEU, S.S., GAVIN, C.E. (1994) Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. J. Physiol.* **267**: C313-C339.

- GUNTER, T.E., CHACE, J.H., PUSKIN, J.S., GUNTER, K.K. (1983) Mechanism of sodium independent calcium efflux from rat liver mitochondria. *Biochemistry* **22**: 6341-6351.
- GUTKNECHT, J. (1988) Proton conductance caused by long-chain fatty acids in phospholipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* **106**: 83-93.
- HALESTRAP, A.P., WOODFIELD, K.Y., CONNERN, C.P. (1997) Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J. Biol. Chem.* **272**: 3346-3354.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Claredon Press - Oxford , pp. 188-277.
- HANSFORD, R.G. & CASTRO, F. (1982) Intramitochondrial and extramitochondrial free calcium concentrations of suspensions of heart mitochondria with very low, plausibly physiological, contents of total calcium. *J. Bioenerg. Biomembr.* **14**: 361-376.
- HANSFORD, R.G. (1985) Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism. *Rev. Phys. Biochem. Pharm.* **102**: 1-72.
- HERMES-LIMA, M., CASTILHO, R.F., MEINICKE, A.R., VERCESI, A.E. (1995) Characteristics of Fe(II)ATP complex-induced damage to the rat liver mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biochem.* **145**: 53-60.
- HERMES-LIMA; M., VALLE ,V.G.R.; VERCESI, A.E., BECHARA, E.J.H. (1991) Damage to rat liver mitochondria promoted by 5-aminolevulinic acid-generated reative oxygen species: connections whit acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim. Biophys. Acta* **1056**: 57-63.
- HOARE, C.A. & WALLACE, F.G. (1966) Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* **212**: 1385-1386.

- HOARE, C.A. (1966) The classification of mammalian trypanosomes *Ergebn Microbiol. Immun. Forsch. Exp. Ther.* **39**: 43-57.
- HOARE, C.A. (1972) *The trypanosomes of mammals, a zoological monograph*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- HOEK, J.B. & RYDSTRON, J. (1988) Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem. J.* **254**: 1-10.
- HONIGBERG, B.M. (1963) A contribution to the systematics of the non-pigmented flagellates. In: *Progress in Protozoology*. Academic Press, NY, p. 68-69.
- HUNTER, D.R., HAWORTH, R.A., SOUTHARD, J.H. (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **251**: 5069-5077
- IGBAVBOA, U., ZWIZINSKI, C.W. & PFEIFFER, D.R. (1989) Release of mitochondrial matrix proteins through a Ca^{2+} -requiring, cyclosporin-sensitive pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**: 619-625.
- INDIG, G., CAMPA, A., BECHARA, E.J.H., CILENTO, G. (1988) Conjugated diene formation promoted by triplet acetone acting upon arachidonic acid. *Photochem. Photobiol.* **48**: 719-723.
- INOUE, T., YOSHIDA, Y., NISHIMURA, M., KUROSAWA, K., TAGAWA, K. (1993) Ca^{2+} induced phospholipase-independent injury during reoxygenation of anoxic mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**: 313-320.
- IRVINE, R.F. (1986) Calcium transients: mobilization of intracellular Ca^{2+} . *Brit. Med. Bull.* **42**: 369-374.

- JEWELL, S.A., BELLOMO, G., THOR, H., ORRENIUS, S., SMITH, M.T. (1982) Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* **217**: 1257-1259.
- JEZEK, P., ENGSTOVA, H., ZACKOVA, M., VERCESI, A.E., COSTA, A.D.T., ARRUDA, P., GARLID, K. (1998) Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**: 319-327.
- KAPLAN, R.S. & PEDERSEN, P.L. (1983) Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **212**: 279-288.
- KLIGENBERG, M. (1989) Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**: 1-14.
- KORSHUNOV, S.S., KORKINA, O.V., RUUGE, E.K., SKULACHEV, V.P., STARKOV, A.A. (1998) Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of $O_2^{\bullet}$ and H_2O_2 by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett.* **435**: 215-218.
- KOWALTOWSKI, A.J. & VERCESI, A.E. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* **26**: 463-471.
- KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., GRIJALBA, M.T., BECHARA, E.J.H., VERCESI, A.E. (1996A) Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **271**: 2929-2934.
- KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. (1995) Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *Am. J. Physiol.* **269**: C141-C147.
- KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. (1996B) Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic

phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett.* **378**: 150-152.

KOWALTOWSKI, A.J., VERCESI, A.E., CASTILHO, R.J. (1997) Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} : correlation with mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta.* **1318**: 395-402.

LANINI, L., BACHS, O., CARAFOLI, E. (1992) The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **267**: 11548-11552.

LARROUY, D., LAHARRAGUE, P., CARRERA, G., VIGUERIE-BASCANDS, N., LEVI-MEYRUEIS, C., FLEURY, C., PECQUER, C., NIBBELINK, M., ANDRE, M., CASTEILLA, L., RICQUIER, D. (1997) Kuffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**: 760-764.

LEHNINGER, A.L., VERCESI, A.E., BABABUNMI, E.A. (1978) Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 6842-6846.

LEMASTERS, J.J., DIGIUSEPPI, J., NIEMINEM, A., HERMAN, B. (1987) Blebbing, free Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* **325**: 78-81.

LE-QUOC, D. & LE-QUOC, K. (1989) Relationship between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **273**: 466-478.

LI, W., SHARIAT-MADAR, Z., POWERS, M., SUN, X., LANE, R.D., GARLID, K.D. (1992) Reconstitution, identification, purification and immunological characterization of the 110kDa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter from beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **267**: 17983-17989.

- LOTSCHER, H.R., WINTERHALTER, K.H., CARAFOLI, E., RICHTER, C. (1979) Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* **76**: 4340-4344.
- LU, H.-G., ZHONG, L., CHANG, K. P., DOCAMPO, R. (1997) Intracellular Ca^{2+} pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *J. Biol. Chem.* **272**: 9464-9473.
- LU, H.-G., ZHONG, L., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M., MORENO, S.N.J., DOCAMPO, R. (1998) Ca^{2+} content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2309-2323.
- MAGILL, A.J. (1995) Epidemiology of the Leishmaniasis. *Dermatol. Clin.* **13**: 505-523.
- MAJIMA, E., SHINOHARA, Y., YAMAGUCHI, N., HONG, Y., TERADA, H. (1994) Importance of loops of mitochondrial ADP/ATP carrier for its transport activity deduced from reactivities of its cysteine residues with the sulfhydryl reagent eosin-5-maleimide. *Biochemistry* **33**: 9530-9536.
- MANSON-BAHR, P.E.C. (1994) Leishmaniasis. In: *Infectious Diseases*. 5th ed., J.B. Lippincott Company, PH, p. 1348-1357.
- MARQUARDT, W.C. & DEMAREE, R.S. (1985) Trypanosomes. In: *Parasitology*, Macmillan Publishing Company, NY, Collier Macmillan Publishers, London, p. 26-40.
- MARTINS, I.S. & VERCESI, A.E. (1985) Some characteristics of Ca^{2+} transport in plant mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **129**: 943-948.
- MARTINS, I.S. CARNIERI, E.G., VERCESI, A.E. (1986) Characteristics of Ca^{2+} transport by corn mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* **850**: 49-56.

- MCCORMACK, J.G. & DENTON, R.M. (1986) Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 258-262.
- MCCORMACK, J.G., HALESTRAP, A.P., DENTON, R.M. (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* **70**: 391-425.
- MCGHEE, R.B. & COSGROVE, W.B. (1980) Biology and physiology of lower trypanosomatid. *Microbiol. Rev.* **44**: 140-173.
- MERRYFIELD, M.L. & LARDY, H.A. (1982) Ca^{2+} -mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of F_{11} from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**: 3628-3635.
- MONTERO, M., ALVAREZ, J., GARCIA SANCHO, J. (1991) Agonist-induced Ca^{2+} influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular calcium stores. *Biochem. J.* **277**: 73-79.
- MORENO, S.N.J., DOCAMPO, R., VERCESI, A.E. (1992A) Calcium homeostasis in procyclic and bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Lack of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} release. *J. Biol. Chem.* **267**: 6020-6026.
- MORENO, S.N.J., SILVA, J., VERCESI, A.E., DOCAMPO, R. (1994) Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.* **180**: 1535-1540.
- MORENO, S.N.J., VERCESI, A.E., PIGNATARO, O.P., DOCAMPO, R. (1992B) Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes: presence of inositol phosphates and lack of an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium pool. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**: 251-262.
- NANTES, I.L., CILENTO, G., BECHARA, E.J.H., VERCESI, A.E. (1995) Chemiluminescent diphenylacetaldehyde oxidation by mitochondria is

- promoted by cytochromes and leads to oxidation injury of the organelle. *Photochem. Photobiol.* **62**: 522-527.
- NAZARETH, W., YAFEI, N., CROMPTON, M. (1991) Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **23**: 1351-1354.
- NICHOLLS, D.G. & ÅKERMAN, K.E.O. (1982) Mitochondrial calcium transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **683**: 57-88.
- NICHOLLS, D.G. (1978) Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. *Biochem. J.* **170**: 511-522.
- NICOTERA, P., BELLOMO, G., ORRENIUS, S. (1990) The role of Ca^{2+} in cell killing. *Chemical Research in Toxicol* **3**: 484-494.
- NICOTERA, P., BELLOMO, G., ORRENIUS, S. (1992) Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**: 449-470.
- NICOTERA, P., MACCONKEY, D.J., JONES, D.P., ORRENIUS, S. (1989) ATP stimulates Ca^{2+} uptake and increases the free Ca^{2+} in isolated rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 453-457.
- NISHIZUKA, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**: 693-698.
- NOVGORODOV, S.A., GUDZ, T.I., BRIERLEY, G.P., PFEIFFER, D.R. (1994) Magnesium ion modulates the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore to cyclosporin A and ADP. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**: 219-228.
- OKAZAKI, T., SAGAWA, N., OKITA, J.R., BLEASDALE, J.E., MACDONALD, P.C., JOHNSTON, J.M. (1981) Diacylglycerol metabolism and arachidonic

- acid release in human fetal membranes and decidua vera. *J. Biol. Chem.* **256**: 7316-7321.
- ORRENIUS, S., MCCONKEY, D.J., BELLOMO, G., NICOTERA, P. (1989). Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharm.Sci.* **10**: 281-283.
- OZ, H., WITTNER, M., TANOWITZ, H.B., BILEZIKIAN, J.P., SAXON, M., MORRIS, S.A. (1992) *Trypanosoma brucei*: the tumor promoter thapsigargin stimulates calcium release from an intracellular compartment in slender bloodstream forms. *Exp. Parasitol.* **74**: 390-399.
- PALMGREN, M.G. (1991) Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanisms and limitations. *Anal. Biochem.* **192**: 316-321.
- PASTORINO, J.G., SNYDER, J.W., SERRONI, A., HOEK, J.B., FARBER, J.L. (1993) Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of culture hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **268**: 13791-13798.
- PETRONILLI, V., CONSTANTINI, P., SCORRANO, L., COLONNA, R., PASSAMONTI, S., BERNARDI, P. (1994) The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. *J. Biol. Chem.* **269**: 16638-16642.
- PHILOSOPH, H. & ZILBERSTEIN, D. (1989) Regulation of intracellular calcium in promastigotes of the human protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **264**: 10420-10424.
- PHUNG, C.D., EZIEME, J.A., TURRENS, J.F. (1994) Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**: 479-482.
- PRESCOTT, S.M. & WHITE, R.L. (1996) Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase 2. *Cell* **87**: 783-786.

- PRESSMAN, B.C. & LARDY, H.A. (1956) Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **21**: 458-466.
- PUSKIN, J.S., GUNTER, T.E., GUNTER, K.K., RUSSEL, P.R. (1976) Evidence for more than one Ca^{2+} transport mechanism in mitochondria. *Biochemistry* **15**: 3834-3842.
- PUTNEY, J.W. (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* **11**: 611-624.
- RADI, R., TURRENS, J.F., CHANG, L.Y., BRUSH, K.M., CRAPO, J.D., FREEMAN, B.A. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **266**: 22028-22034.
- REED, K.C. & BYGRAVE, F.L. (1974A) Inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. *Biochem. J.* **140**: 143-155.
- REED, K.C. & BYGRAVE, F.L. (1974B) Accumulation of lanthanum by rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **138**: 239-252.
- REEVES, J.P. & CHEON, J. (1989) The cardiac sodium-calcium exchange system. In *Cell Calcium Metabolism*. (Fiskum, G. ed.) Plenum Plublish.Corp., New York, 27-31.
- REEVES, J.P. & HALE, C.C. (1984) The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *J. Biol. Chem.* **259**: 7733-7739.
- REY, L. (1991) Flagelados parasitos do sangue e dos tecidos: Trypanosomatidae. In: *Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem das Américas e na África*, Guanabara Koogan, p. 115.
- RICHTER, C. & FREI, B. (1988) Ca^{2+} release from mitochondria induced by prooxidants. *Free Radical Biol.Med.* **4**: 365-375.

- RICHTER, C., GOGVADZE, V., LAFFRANCHI, R., SCHLAPBACH, R., SCHWEIZER, M., SUTER, M., WALTER, P., YAFFEE, M. (1995) Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271**: 67-74.
- ROBINSON, J. & COOPER J.M. (1970) Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the electrode. *Anal. Biochem.* **33**: 390-399.
- RODRIGUES, C.O., SCOTT, D.A., DOCAMPO, R. (1999) Presence of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase in promastigotes of *Leishmania donovani* and its localization to a different compartment from the vacuolar H⁺-ATPase. *Biochem. J.* **340**: 759-766.
- ROTTEMBERG, H. & SCARPA, A. (1974) Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. *Biochemistry* **13**: 4811-4817.
- RUBEN, L. & AKINS, C.D. (1992) *Trypanosoma brucei*: the tumor promoter thapsigargin stimulates calcium release from an intracellular compartment in slender bloodstream forms. *Exp. Parasitol.* **74**: 332-339.
- RUBEN, L., AKINS, C.D., HAGHIGHAT, N.G., XUE, L. (1996) Calcium influx in *Trypanosoma brucei* can be induced by amphiphilic peptides and amines. *Mol. Biochem. Parasitol.* **81**: 191-200.
- RUBEN, L., HUTCHINSON, A., MOEHLMAN, J. (1991) Calcium homeostasis in *Trypanosoma brucei*. Identification of a pH-sensitive non-mitochondrial calcium pool. *J. Biol. Chem.* **266**: 24351-24358.
- RUGOLO, M., PISTOCCHI, R., ZANNONI, D. (1990) Calcium ion transport in higher plant mitochondria (*Helianthus tuberosus*). *Physiol. Plant.* **79**: 297-302.
- SAMARTSEV, V.N., MOKHOVA, E.N., SKULACHEV, V.P. (1997) The pH-dependent reciprocal changes in contributions of ADP/ATP antiporter and

- aspartate/glutamate antiporter to the fatty acid-induced uncoupling. *FEBS Lett.* **412**: 179-182.
- SARIS, N.E.L. & ÁKERMÁN, K.E.O. (1980) Uptake and release of bivalent cations in mitochondria. *Curr. Topics Bioenerg.* **10**: 104-179.
- SCARPA, A. (1979) Measurements of cation transport with metallochromic indicators. *Meth. Enzymol.* **56**: 301-338.
- SCHERER, B. & KLIGENBERG, M. (1974) Demonstration of relationship between the adenine nucleotide carrier and the structural changes of mitochondria as induced by adenosine 5'-diphosphate. *Biochemistry* **13**: 161-169.
- SCHMATZ, D.M. & MURRAY, P.K. (1982) Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in irradiated muscle cells: improved synchronization and enhanced trypomastigote production. *Parasitology* **85**: 115-125.
- SCHMIDT, G.D. & ROBERTS, L.S. (1989) Kinetoplastida: Trypanosomes and their kin. In: *Foundations of Parasitology*. 4th ed., Times Mirror/Mosby College Publishing, p. 55-80.
- SCHMIDT, G.D. & ROBERTS, L.S. (1996) Kinetoplastida: Trypanosomes and their kin. In: *Foundations of Parasitology*. 5th ed., Times Mirror/Mosby College Publishing, p. 53-80.
- SCHNEIDER, W.C. & HOGEBOM, G.H. (1950) Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* **183**: 123-128.
- SCOTT, D.A., DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M., ZHONG, L., LU, H.-G., MORENO, S.N.J., ND DOCAMPO, R. (1998) Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **273**: 22151-22158.

- SCOTT, D.A., DOCAMPO, R., DVORAK, J.A., SHI, S., LEAPMAN, R.D. (1997) *In situ* compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **272**: 28020-28029.
- SCOTT, D.A., MORENO, S.N.J., DOCAMPO, R. (1995) Ca^{2+} storage in *Trypanosoma brucei*: the influence of cytoplasmic pH and importance of vacuolar acidity. *Biochem. J.* **310**: 780-794.
- SHAPIRO, T.A. & ENGLUND, P.T. (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 117-143.
- SHENG, H., SHAO, J., KIRKLAND, S.C., ISAKSON, P., COFFEY, R.J., MORROW, J., BEAUCHAMP, R.D., DUBOIS, R.N. (1997) Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase 2. *J. Clin. Invest.* **99**: 2254-2259.
- SHUTTLEWORTH, T.J. & THOMPSON, J.L. (1998) Muscarinic receptor activation of arachidonate-mediated Ca^{2+} entry in HEK293 cells is independent of phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **273**: 32636-32643.
- SHUTTLEWORTH, T.J. (1996) Arachidonic acid activates the noncapacitative entry of Ca^{2+} during $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations. *J. Biol. Chem.* **271**: 21720-21725.
- SIES, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **25**: 1058-1071.
- SKULACHEV, V.P. (1991) Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **294**: 158-162.
- SKULACHEV, V.P. (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**: 100-124.
- SMITH, W.L. (1992) Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* **268**: 181-191.

- SOMLYO, A.P., URBANICS, R. VADASZ, G., KOVACH, A.G.B., SOMLYO, A.V. (1985) Mitochondrial calcium and cellular electrolytes in brain cortex frozen *in situ*: electron probe analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**: 1071-1078.
- SORRENTINO, V. & VOLPE, P. (1993) Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol. Sci.* **14**: 98-103.
- STOJDL, D.F. & CLARKE, M.W. (1996) *Trypanosoma brucei*: analysis of cytoplasmic Ca^{2+} during differentiation of bloodstream stages *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **83**: 134-146.
- SUTTON, H.C. & WINTERBOURN, C.C. (1989) On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton Reactions. *Free Rad. Med. Biol.* **6**: 53-60.
- TAKEYAMA, N., MATSUO, N., TANAKA, T. (1993) Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca^{2+} -dependent inner membrane permeability transition. *Biochem. J.* **294**: 719-725.
- TANGERAS, A., FLATMARK, T., BÄCKSTROM, D., EHRENBORG, A. (1980) Mitochondrial iron not bound in heme and iron-sulfur centers. *Biochim. Biophys. Acta* **589**: 162-175.
- TEAGUE, W.M., PETTIT, F.H., WU, T.L., SIBERMAN, S.R., REED, L.J. (1982) Purification and properties of pyruvate dehydrogenase phosphatase from bovine heart and kidney. *Biochemistry* **21**: 5585-5592.
- THUN, M.J., NAMBOODIRI, M.M., HEATH, C.W. (1991) Aspirine use and reduced risk of fatal colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **325**: 1593-1596.
- TRUMP, B.F. & BEREZESKY, I.K. (1995) Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* **9**: 219-228.

- TSUJII, M. & DUBOIS, R.N. (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* **83**: 493-501
- UKOLI, F.M.A. (1984) Phylum Sarcomastigophora: Haemoflagellates. In: *Introduction to Parasitology in Tropical Africa*. p. 364-389.
- VALLE, V.G.R., FAGIAN, M.M., PARENTONI, L.S., MEININCKE, A.R., VERCESI, A.E. (1993) The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**: 1-7.
- VERCESI, A.E. & DOCAMPO, R. (1992) Ca^{2+} transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca^{2+} , pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. *Biochem. J.* **284**: 463-467.
- VERCESI, A.E. & DOCAMPO, R. (1996) Sodium-proton exchange stimulates Ca^{2+} release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* **315**: 265-270.
- VERCESI, A.E. & HOFFMANN, M.E. (1993) Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. In *Methods in Toxicology "Mitochondrial Dysfunction"* (D.P.Jones, L.H.Lash, eds), Vol.2, Chapter 21, Academic Press, New York.
- VERCESI, A.E. (1984A) Dissociation of NAD(P)^+ -stimulated mitochondrial Ca^{2+} efflux from swelling and membrane damage. *Arch. Biochem. Biophys.* **232**: 86-91.
- VERCESI, A.E. (1984B) Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)^+ -stimulated Ca^{2+} efflux from mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**: 305-310.

- VERCESI, A.E. (1987) The participation of NADP, the transmembrane potencial and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**: 171-178.
- VERCESI, A.E. (1993) Ca^{2+} transport and oxidative damage of mitochondria. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **26**: 441-457.
- VERCESI, A.E., BERNARDES, C.F., HOFFMANN, M.E., GADELHA, F.R., DOCAMPO, R. (1991A) Digitonin-permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J. Biol. Chem.* **266**: 14431-14434.
- VERCESI, A.E., CASTILHO, R.F., MEINICKE, A.R., VALLE, V.G.R., HERMES-LIMA, M., BECHARA, E.J.H. (1994A) Oxidative damage of mitochondria induced by 5-aminolevulinic acid: role of Ca^{2+} ions and membrane protein thiols. *Biochim. Biophys. Acta.* **1188**: 86-92.
- VERCESI, A.E., DOCAMPO, R., MORENO, S.N.J. (1992) Energization-dependent Ca^{2+} accumulation in *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic trypomastigotes mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**: 251-257.
- VERCESI, A.E., FERRAZ, V.L., MACEDO, D.V., FISKUM, G. (1988) Ca^{2+} -dependent NAD(P)⁺-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 934-941.
- VERCESI, A.E., GRIJALBA, M., DOCAMPO, R. (1997B) Inhibition of Ca^{2+} release from *Trypanosoma brucei* acidocalcisomes by 3,5-dibutyl-4-hydroxytoluene: role of the Na^+/H^+ exchanger. *Biochem. J.* **328**: 479-482.
- VERCESI, A.E., HERMES-LIMA, M., MEYER-FERNANDES, J.R., VIEYRA, A. (1990) Calcium inhibition of the $\text{ATP}[^{32}\text{P}]\text{Pi}$ exchange and of net

- ATPsynthesis catalysed by bovine submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**: 101-106.
- VERCESI, A.E., HOFFMANN, M.E., BERNARDES, C.F., DOCAMPO, R. (1993A) ATP and Ca^{2+} homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **26**: 355-366.
- VERCESI, A.E., HOFFMANN, M.E.; BERNARDES, C.F., DOCAMPO, R. (1991B) Regulation of intracellular calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. Effects of calmidazolium and trifluoperazine. *Cell Calcium* **12**: 361-369.
- VERCESI, A.E., KOWALTOWSKI, A.J., GRIJALBA, M.T., MEINICKE, A.R., CASTILHO, R.F. (1997A) The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosc. Rep.* **17**: 43-52.
- VERCESI, A.E., MORENO, S.N.J. DOCAMPO, R. (1994B) $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* **304**: 227-233.
- VERCESI, A.E., MORENO, S.N.J., BERNARDES, C.F., MEINICKE, A.R., FERNANDES, E.C., DOCAMPO, R. (1993B) Thapsigargin causes Ca^{2+} release and collapse of the membrane potential of *Trypanosoma brucei* mitochondria *in situ* and of isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **268**: 8564-8568.
- VERCESI, A.E., PEREIRA-DA-SILVA, L., MARTINS, I.S., CARNIERI, E.G.S., BERNARDES, C.F., FAGIAN, M.M. (1989) Cell calcium metabolism (Fiskum G.ed.) Plenum Press, New York, pp.103-111.
- VERCESI, A.E., REYNAFARJE, B., LEHNINGER, A.L. (1978) Stoichiometry of H^{+} ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **253**: 6379-6385.
- VICKERMAN, K. (1969) On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *J. Cell. Sci.* **5**: 163-169.

- VICKERMAN, K. (1976) The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London, NY, v. 1, p. 1-30.
- VINAGRADOV, A.S. & SCARPA, A. (1973) The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **248**: 5527-5531.
- WIECKOWSKI, M.R. & WOJTCZAK, L. (1997) Involvement of the dicarboxylate carrier in the protonophoric action of long-chain fatty acids in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**: 414-417.
- WIECKOWSKI, M.R. & WOJTCZAK, L. (1998) Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett.* **423**: 339-342.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1991) WHO Tech. Resp. Series No. 811, Word Health Organization, Geneva.
- XIONG, Z-H. & RUBEN, L. (1996) Nuclear calcium flux in *Trypanosoma brucei* can be quantified with targeted aequorin. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**: 57-67.
- XIONG, Z-H. & RUBEN, L. (1998) *Trypanosoma brucei*: the dynamics of calcium movement between the cytosol, nucleus, and mitochondrion of intact cells. *Exp. Parasitol.* **88**: 231-239.
- XIONG, Z-H., RIDGLEY, E.L., ENIS, D., OLNESS, F., RUBEN, L. (1997) Selective transfer of calcium from an acidic compartment to the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. Measurements with targeted aequorins. *J. Biol. Chem.* **272**: 31022-31028.
- ZENG, Y.; HAN, X.; SCHLESINGER, P., GROSS, R.W. (1998) Nonesterified fatty acids induce transmembrane monovalent cation flux: host-guest interactions as determinants of fatty acid-induced ion transport. *Biochemistry* **37**: 9497-9508.

- ZHANG, H.S., MCDONALD, T.V., TANOWITZ, H.B., WITTNER, M., WEISS, L.M., BILEZIKIAN, J.P., MORRIS, S.A. (1998) Intracellular Ca^{2+} homeostasis in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Euk. Microbiol.* **45**: 80-86.
- ZORATTI, M. & SZABÒ, I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**: 139-176.

8. APÊNDICE

ANEXO I - CURRICULUM VITAE

1 – IDENTIFICAÇÃO

1.1. Nome: Rosana Catisti

1.2. Filiação: João Catisti Filho

Ana Riul Catisti

1.3. Naturalidade: Jardinópolis - SP

1.4. Data de Nascimento: 06/03/59

1.5. Residência e Domicílio: rua Urca, 576, San Conrado, Distrito de Sosas, CEP 13130-590 - Campinas - SP

1.6. Cédula de Identidade : 10.405.845

Expedidor: Secretaria de Segurança Pública

Local e data da Expedição: Ribeirão Preto SP 14/05/1976

1.7. Conselho Regional de Farmácia CRF 8 - 8.187, S.P.

Expedição 08/04/1980

2 – ESCOLARIDADE

2.1. Primeiro e Segundo Graus

Instituição: Escola Estadual de 2 grau "Otoniel Mota"

Cidade: Ribeirão Preto - SP

Data da conclusão: 1976

2.2. Superior

Instituição: Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Cidade: Ribeirão Preto - SP

Data da conclusão: 18/12/1980

2.3. Pós Graduação: Mestre em Biologia Molecular

Título: Proteção, por quinina, contra as lesões mitocondriais geradas por cálcio.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina

Cidade: São Paulo - S.P.

Data da conclusão: 25/03/98

3 - FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

3.1. Especialista em Homeopatia

Instituição: Instituto Homeopático François Lamasson

Cidade: Ribeirão Preto - S.P.

Data da conclusão: dezembro de 1982.

3.2. Estágios

Instituição: Laboratório Bioenergética, da disciplina de Bioquímica, Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P.

Supervisor: Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi

Período: agosto a dezembro de 1991,
janeiro de 1995 a março de 1996.

3.3. Instituição: University of Illinois at Urbana-Champaign, College of Veterinary Medicine, Department Pathobiology, Urbana-Champaign, Illinois, USA, Laboratory of Molecular Parasitology.

Supervisores: Prof. Dr. Anibal E. Vercesi e Prof. Dr. Roberto Docampo

Períodos: 04 de maio a 02 de julho de 1995,
25 de setembro a 25 de outubro 1998,
15 de janeiro a 08 de fevereiro de 2000.

4. ATIVIDADES

4.1. Atividades profissionais

4.1.1. Farmacêutica Responsável Técnica da Farmácia Homeopática Homeoceter

Cidade: Ribeirão Preto - S.P.

Período: 1983 a 1984

4.1.2. Proprietária e Responsável Técnica da Farmácia Homeopática Flor de Lis

Cidades: Votuporanga e Campinas - S.P.

Período: 1984 a 1994

4.2. Atividades Didáticas

4.2.1 Instituição: Instituto Homeopático François Lamasson

Cidade: Ribeirão Preto - S.P.

Cargo: professora auxiliar aulas práticas

Período: 1983 a 1984

4.2.2. Instituição: Fundação Educacional de Votuporanga

Cidade: Votuporanga - S.P.

Cargo: professora assistente de Bioquímica

Período: 1987

4.3. Atividade Atual: Doutorado em Ciências, Área de Concentração Ciências Biomédicas

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Cidade: Campinas - S.P.

Orientador: Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi

Início: Março 1998

5. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

5.1. Vercesi, A.E., **Catisti, R.** and Docampo, R. (1995). "Calcium release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*". American Society of Tropical Medicine & Hygiene. New Orleans, USA. 19/11/1995. 143.

5.2. **Catisti, R.**; Castilho, R.F. and Vercesi, A.E. (1996). "Quinine protects isolated rat liver mitochondria against oxidative damage induced by Ca^{2+} plus t-butylhidroperoxide or Fell Citrate". Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq. Caxambu, M.G., BR. 05/1996. A-30, pg.5.

5.3. Nantes, I.L., Gadelha, F.R., Matsushima, E., Costa, A.D.T., **Catisti, R.**, Di Mascio, P. and Vercesi, A.E. (1997). "Reaction off peroxyntirite with hydrogen peroxide: opposite effects on membrane lipids and protein thiol groups". Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq. Caxambu, M.G., BR. 05/1997. S-29, pg. 16.

5.4. **Catisti, R.** and Vercesi, A.E. (1997) "Quinine protects isolated mitochondria against oxidative damage induced by calcium". VI Simpósio Internacional em Medicina Ortomolecular. Sociedade Internacional de Medicina Ortomolecular, SP, BR, 08/97.P-26, pg. 148.

5.5. Milani, G., **Catisti, R.** and Vercesi, A.E. (1997). "Mitochondrial membrane potencial and Ca^{2+} transport in permeabilized Walker 256 tumor cells: effect of $\text{NAD(P}^+)$ redox state". VI Simpósio Internacional em Medicina Ortomolecular. Sociedade Internacional de Medicina Ortomolecular, SP, BR, 08/97.P-19, pg. 141.

5.6. **Catisti, R.** and Vercesi, A.E. (1998). "Quinine protects isolated mitochondria against oxidative damage induced by calcium". Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq. Caxambu, M.G., BR.

05/1998. A-9, pg. 2.

5.7. **Catisti, R.** and Vercesi, A.E. (1998) "Quinine protects mitochondria against oxidative damage induced by calcium". 10th European Bioenergetics Conference, Goteborg, Sweden 27/06 a 2/07/98, H1, pg 119.

5.8. **Catisti, R.**, Uyemura, S.A., Docampo, R. and Vercesi, A.E. (1999) "Calcium mobilization by nonesterified fatty acids in trypanosomatids". Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq. Caxambu, M.G., BR. 05/1999. A-6, pg. 1.

5.9. Costa, M.L.B., **Catisti, R.** and Vercesi, A.E. (1999) "Cyclosporin A prevents both adenine nucleotide carrier change in conformation and permeability transition pore opening". Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq. Caxambu, M.G., BR. 05/1999. A-23, pg. 4.

5.10. **Catisti, R.**, Uyemura, S.A., Docampo, R. and Vercesi, A.E. (1999) "Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids" Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94(II), S7-3, pg. 39.

5.11. **Catisti, R.** and Vercesi, A.E. (2000). "On the mechanism of the fatty acid-induced mitochondrial permeability transition". Keystone Symposia, Mitochondrial Dysfunction in Pathogenesis, Santa Fe, New Mexico, U.S.A., 01/2000. A-4 210, pg 70.

5.12. **Catisti, R.** and Vercesi, A.E. (2000). "On the mechanism of the fatty acid-induced mitochondrial permeability transition". Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq. Caxambu, M.G., BR. 05/2000. A-19, pg4.

6 – PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS INTERNACIONAIS

6.1. **Catisti, R.** and Vercesi, A.E. (1999). "Permeability transition pore closure by quinine". *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**: 151-155.

6.2. Nantes, I.L., Fagian, M., **Catisti, R.**, Arruda, P., Leite, A. and Vercesi, A.E. (1999) "Low temperature and aging-promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria". *FEBS Letts* **457**: 103-106.

6.3 **Catisti, R.** and Vercesi, A.E. (1999) "The participation of pyridine nucleotides redox state and reactive oxygen in the mechanism of fatty acids-induced permeability transition in rat liver mitochondria" *FEBS Letts* **464**: 97-101.

6.4. **Catisti, R.**, Uyemura, S.A., Docampo, R. and Vercesi, A.E. (2000) "Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids". *Mol. Biochem Parasitol.* **105**: 261-271.

6.5. Vercesi, A.E., Rodrigues, C.O., **Catisti, R.** and Docampo, R. (2000) "Presence of Na⁺/H⁺ exchanger in the acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs" ". *FEBS Letts* **473**: 203-206.

6.6. Fortes, F., Castilho, R.F., **Catisti, R.**, Carnieri, E.G.S., Vercesi, A.E. (2001) Ca²⁺ induces a cyclosporin A-insensitive permeability transition pore like in isolated potato tuber mitochondria mediated by a reactive oxygen species. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **33**: 43-51.

6.7. Rodrigues, C.O., **Catisti, R.**, Uyemura, S.A., Vercesi, A.E., Lira, R., Urbina, J.A., Docampo, R. (2001) The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in different sensitivity to digitonin-permeabilization. Submetido ao *Journal of Eukaryotic Microbiology*.

7 – OUTRAS INFORMAÇÕES BIOGRÁFICAS RELEVANTES:

7.1. Colaboração na Orientação de Alunos (co-orientação)

Maria Laura B. Costa – Iniciação Científica – 1998-1999

7.2. Prova de Qualificação para Defesa de Tese do Doutorado

Apresentada e aprovada em 04 de julho de 2000

Título: Leptina e Bioenergética Mitocondrial

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE