Participação da Mitocôndria na Regulação da Viabilidade Celular

Alicia J. Kowaltowski

Documento apresentado ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção de título de Livre-Docente junto ao Departamento de Bioquímica.

Agosto de 2004

*Satisfaction of one's curiosity is one of the greatest
sources of happiness in life.*

Linus Pauling
1901-1994

Agradecimentos

Aos Professores Anibal E. Vercesi, Roger F. Castilho, Gary Fiskum e Keith D. Garlid por ter me ensinado a fazer Ciência, pela colaboração e apoio contínuos.

Aos meus alunos, por tudo que me ensinaram, e em especial ao Eduardo Belisle, Fernando Ruy, Mirian M. da Silva, Adriano Sartori, Renato Ferranti, Graciele A. de Oliveira, Erich B. Tahara, Juliana G. de Paula, Hebert T. F. Facundo, Raquel S. Carreira e Luis C. G. Ramos, pelos projetos desenvolvidos e em desenvolvimento.

Aos Professores Martin Jaburek, Petr Paucek, Luis E. S. Netto, Etelvino J. Bechara, Mario H. Barros, Nancy A. Rebouças, Hernan Chaimovich, M. Lucia Bianconi, Mauricio S. Baptista, Marisa H. G. Medeiros, Ohara Augusto, Sergio Verjovski-Almeida, Robert G. Fenton e Anatoly A. Starkov pelas valiosas colaborações e discussões.

Aos alunos e pós-doutores que participaram dos trabalhos contidos nesta tese: Subramaniam Seetharaman, Robert Bajgar, Paula B. M. Andrade, Douglas V. Cancherini, Leonardo G. Trabuco, Ricardo G. Cosso e Cláudia B. Campos.

Aos técnicos que ajudam a manter o laboratório: Edson A. Gomes, Camille C. Caldeira da Silva e Elizabete A. Santos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Instituto de Química pela ajuda administrativa e organização de documentação.

À minha família, pelo apoio incondicional. Ao Professor Tomasz Kowaltowski pela leitura crítica do meu Memorial.

Aos Professores Mario H. Barros e Roger F. Castilho pela leitura crítica desta Tese.

Ao financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, *National Institutes of Health*, Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Índice

Abreviações	6
Introdução	7
A Estrutura da Mitocôndria	7
Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa	9
Espécies Reativas de Oxigênio Mitocondriais	10
Transporte Mitocondrial de K⁺	14
Isquemia, Reperfusão e Pré-Condicionamento Cardíaco	17
Proteínas Mitocondriais Pró- e Anti-Apoptóticas	20
Considerações Finais	24
Referências	25
Anexo I Kowaltowski, A.J., Seetharaman, S., Paucek, P., Garlid K.D. (2001) Bioenergetic consequences of mitochondrial ATP-sensitive K ⁺ channel opening. <i>American Journal of Physiology</i> 280: H649-657.	33
Anexo II Bajgar, R., Seetharaman, S., Kowaltowski, A.J., Garlid, K.D., Paucek, P. (2002) Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. <i>Journal of Biological Chemistry</i> 276: 33369-33374.	43
Anexo III dos Santos, P., Kowaltowski, A.J., Laclau, M.N., Seetharaman, S., Paucek, P., Boudina, S., Thambo, J.-B., Tariosse, L., Bonoron-Adèle, S., Garlid, K.D. (2002) Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive potassium channel protects the ischemic heart. <i>American Journal of Physiology</i> 283: H296-H301.	50
Anexo IV Belisle, E., Kowaltowski, A.J. (2002) Mitochondrial ATP-sensitive K ⁺ channels increase ischemic ATP levels and prevent reperfusion injury. <i>Journal of Bioenergetics and Biomembranes</i> 34: 285-298.	63
Anexo V Kowaltowski, A.J., Cosso, R.G., Campos, C.B., Fiskum, G. (2002) Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. <i>Journal of Biological Chemistry</i> 277: 42802-42807.	78

Anexo VI	85
Ruy, F., Vercesi, A.E., Andrade, P.B.M., Bianconi, M.L., Chaimovich H., Kowaltowski, A.J. (2004) A highly active ATP-insensitive K ⁺ import pathway in plant mitochondria. <i>Journal of Bioenergetics and Biomembranes</i> 36: 195-202.	
Anexo VII	94
Kowaltowski, A.J., Fenton, R.G., Fiskum, G. (2004) Bcl-2 family proteins regulate mitochondrial reactive oxygen production and protect against oxidative stress. <i>Free Radical Biology & Medicine</i> (submetido).	
Anexo VIII	110
Barros, M.H., Netto, L.E.S., Kowaltowski, A.J. (2003) H ₂ O ₂ generation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> respiratory pet mutants: effect of cytochrome c. <i>Free Radical Biology & Medicine</i> 35: 179-188.	
Anexo IX	121
Ferranti, R., da Silva, M.M., Kowaltowski, A.J. (2003) Mitochondrial ATP-sensitive K ⁺ channel opening decreases reactive oxygen species generation. <i>FEBS Letters</i> 536: 51-55.	
Anexo X	127
da Silva, M.M., Sartori, A., Belisle, E., Kowaltowski, A.J. (2003) Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H ₂ O ₂ release and enhances K ⁺ transport. <i>American Journal of Physiology</i> 285: H154–H162.	
Anexo XI	137
Cancherini, D.V., Trabuco, L.G., Rebouças, N.A., Kowaltowski, A.J. (2003) ATP-sensitive K ⁺ channels in renal mitochondria. <i>American Journal of Physiology</i> 285: F1291-F1296.	

Abreviações

ADP:	Adenosina 5'-difosfato
ATP:	Adenosina 5'-trifosfato
DZX:	Diazóxido
EROs:	Espécies reativas de oxigênio
FIA:	Fator indutor de apoptose
H₂O₂:	Peróxido de hidrogênio
HO·:	Radical hidroxila
mitoK_{ATP}:	Canal mitocondrial de K ⁺ sensível a ATP
mitoKIR:	Retificador interno do canal mitocondrial de K ⁺
mitoSUR:	Receptor de sulfoniluréias do canal mitocondrial de K ⁺
NAD⁺:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NO·:	Óxido nítrico
NOS:	Sintase de óxido nítrico
O₂^{·-}:	Radical ânion superóxido
ONOO·:	Peroxinitrito
Pi:	Fosfato inorgânico
SMAC/Diablo:	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP binding protein with low pI</i>
SOD:	Superóxido dismutase
TPM:	Transição de permeabilidade mitocondrial
UQ:	Coenzima Q oxidada
UQH·:	Radical ânion semiquinona
UQH₂:	Coenzima Q reduzida
VDAC:	<i>Voltage dependent anion channel</i>

Introdução

A associação entre bactérias aeróbicas produtoras de hidrogênio e os ancestrais das atuais células eucarióticas trouxe o indubitável benefício de produzir ATP através da fosforilação oxidativa (Martin e Muller, 1998). Esta associação também trouxe outras vantagens, pois a mitocôndria apresenta uma grande riqueza de papéis dentro da fisiologia celular além de sua função no metabolismo energético (revisado por Zorov et al, 1997; Kowaltowski, 2000). Como exemplos, sua matriz consiste num espaço de alta capacidade para o armazenamento de íons Ca^{2+} (revisado por Gunter e Gunter, 2001) e contém enzimas essenciais para a síntese de uréia e modificação de grupos heme (revisado por Atamna et al., 2002). Além disso, o funcionamento da cadeia respiratória garante baixas tensões de oxigênio intracelular, evitando oxidações indesejáveis (Halliwell e Gutteridge, 1999). Ao mesmo tempo, a cadeia de transporte de elétrons também é um dos principais geradores de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) sinalizadoras ou danosas à célula (Boveris e Chance, 1973; Boveris e Cadenas, 1975; Boveris, 1977; Sohal e Weindruch, 1996; Turrens, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999; Barja, 1999; Kowaltowski e Vercesi, 1999; Wallace, 1999; Cadenas e Davies, 2000; Kowaltowski e Vercesi, 2001, St-Pierre et al., 2002). Finalmente, a mitocôndria contém uma variedade de proteínas envolvidas na regulação da morte celular apoptótica, um processo altamente regulado de eliminação celular que é dependente de energia (revisado por Kroemer et al., 1995; Lemasters et al., 1998; Budihardjo et al., 1999; Crompton, 1999; Adams e Cory, 2001; Danial e Korsmeyer, 2004).

Dada a importância e riqueza das funções exercidas pela mitocôndria, não é surpreendente constatar que sua integridade e funcionalidade podem afetar a viabilidade celular. Há evidências claras que fenômenos mitocondriais participam como iniciadores, amplificadores e reguladores de sinais que levam à sobrevivência celular frente a injúrias (revisado por Liu et al, 1999; Gross, 2000; O'Rourke, 2000; Garlid et al., 2003; Oldenburg et al., 2003) ou morte celular frente a lesões ou sinais pró-apoptóticos (revisado por Hess e Manson, 1984; Duchon et al., 1993; Crompton, 1999; Budihardjo et al., 1999; Adams e Cory, 2001; Mattson e Kroemer, 1993; Coultas e Strasser, 2003; Danial e Korsmeyer, 2004). Nosso interesse tem sido o entendimento da regulação da viabilidade celular por proteínas e funções mitocondriais.

A Estrutura da Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela intracelular de forma e dimensões distintas dependendo do tecido e estado metabólico em que se encontra, com diâmetro em torno de 0,2 a 1 μM . É formada por duas membranas. A membrana externa, de menor superfície, é composta principalmente por fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, sendo muito mais pobre em fosfatidilserina, colesterol e esfingomielina que a membrana plasmática (Daum, 1985). Esta membrana é rica em um grande canal com estrutura de β barril, o

voltage-dependent anion channel (VDAC), que permite a passagem de solutos de até 5000 Da (Colombini, 1987). A membrana interna é composta principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipina (Daum, 1985), e apresenta múltiplas invaginações ou cristas mitocondriais. A estrutura dessas invaginações foi recentemente reconstruída tridimensionalmente, e demonstra grande complexidade (Frey e Mannella, 2000). Esta membrana é extremamente rica em proteínas, que podem chegar a compor mais de 50% de seu peso seco (Daum, 1985). Dentre as proteínas presentes nessa membrana se encontram os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase, que realizam a fosforilação oxidativa, e transportadores dos intermediários das vias metabólicas que incluem enzimas intra-mitocondriais.

O espaço entre as duas membranas, apesar de ser extremamente pequeno (Frey e Mannella, 2000), tem grande importância fisiológica. Neste espaço se encontram enzimas com funções importantes dentro do metabolismo energético como o citocromo c, creatina quinase e adenilato quinase. Recentemente, foram localizados no espaço intermembranas diversas proteínas regulatórias da viabilidade celular, incluindo o próprio citocromo c, pró-caspase 9, SMAC/Diablo e fator indutor de apoptose.

A matriz abriga o DNA mitocondrial. Em células humanas há em média 10 moléculas de DNA circular em cada mitocôndria. Esse DNA mitocondrial não é protegido por histonas, e é responsável pela codificação de 13 polipeptídeos componentes da cadeia respiratória. São conhecidos mais de 100 mutações no DNA mitocondrial de pacientes com diversos sintomas clínicos como na síndrome de Leber e encefalopatia mitocondrial associada à acidose láctica (MELAS), entre outras (revisto em Schon et al., 1997).

Na matriz mitocondrial há também enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, da β oxidação de ácidos graxos e parte das enzimas do ciclo da uréia, dentre outras. A grande riqueza de proteínas na matriz mitocondrial confere a este espaço uma força coloidosmótica capaz de estimular a entrada de água e aumento de volume deste espaço quando o aporte de íons ao interior da organela é aumentado (Garlid e Beavis, 1985; Beavis et al., 1985). Recentemente, comprovamos que a ativação de canais mitocondriais de K^+ sensíveis a ATP (Anexos I e II) leva a um aumento do volume da matriz mitocondrial com conseqüente diminuição do espaço intermembranas (Anexo III). Essas alterações parecem ser importantes para a regulação do transporte de ADP e ATP para o interior da mitocôndria (Anexos III e IV).

Alterações da estrutura mitocondrial ocorrem quando há modificação do estado funcional da organela (Mannella e Parsons, 1977; Hertsens e Jacob, 1987) e também podem ser passos iniciais de algumas formas de morte celular. Como exemplos, o inchamento mitocondrial com perda da integridade da membrana externa pode ser um evento iniciador da morte celular necrótica ou apoptótica (revisado por Kroemer et al., 1995; Lemasters et al., 1998; Halestrap, 1999; Crompton, 1999; Kowaltowski et al., 2001). A estrutura mitocondrial também pode ser alterada por proteínas pró- (Scorrano et al., 2002) e anti-apoptóticas (Anexo V, veja "Proteínas Mitocondriais Pró- e Anti-Apoptóticas").

Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

A cadeia respiratória mitocondrial transforma energia redutora em um potencial de prótons transmembrana. Na cadeia respiratória “clássica” (veja Fig. 1), elétrons provenientes de diferentes substratos são colecionados na forma de NADH e transferidos para o átomo de ferro central da NADH desidrogenase. O complexo I então transfere elétrons para a forma oxidada da coenzima Q (UQ), levando a sua redução (UQH₂). Elétrons originários do succinato são transferidos para FAD e UQ pelo complexo II, resultando também em sua redução. A UQ pode ser reduzida também pela glicerol-fosfato desidrogenase, na presença de glicerol-3-fosfato, ou pela acil-CoA desidrogenase (revisado por Nicholls e Ferguson, 2002).

A UQH₂ é então desprotonada, resultando na formação do ânion semiquinona (UQH[•]), responsável pela doação de elétrons ao citocromo b-c₁ e posteriormente ao citocromo c. Existem dois *pools* distintos de UQH[•], um localizado na face citoplasmática da membrana mitocondrial interna, e outro na face matricial da membrana. As duas formas de UQH[•] são combinadas quando oxidadas, regenerando UQ e doando seus elétrons. O citocromo c então transporta elétrons para a citocromo c oxidase, responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio, que resulta na formação de água. Esta passagem de elétrons se dá em quatro passos consecutivos de um elétron, devido à característica triplete do oxigênio (Turrens, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999). A passagem de elétrons pelas NADH desidrogenase, citocromo b-c₁ e citocromo c oxidase é acompanhada do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. O gradiente de prótons gerado favorece a re-entrada destes para a matriz mitocondrial através da ATP sintase, que utiliza a energia protonmotriz para promover a síntese de ATP (Nicholls e Ferguson, 2002).

O transporte de elétrons na cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa devem ser regulados para a manutenção da funcionalidade e viabilidade celular. A falta de síntese mitocondrial de ATP pode levar à falência energética

Fig. 1 – Transporte de elétrons em mitocôndrias de mamíferos.

celular e morte necrótica (Kristian e Siesjo, 1998; Lemasters et al., 1998; Fiskum et al., 1998; Crompton, 1999), provocar o acúmulo de EROs mitocondriais (Boveris e Cadenas, 1975; Skulachev, 1997; Kowaltowski e Vercesi, 2001) e, possivelmente, diminuir a longevidade (Sohal e Weindruch, 1996; Barja, 1999; Cadenas e Davies, 2000).

Fisiologicamente, o transporte de elétrons e fosforilação oxidativa podem ser regulados por níveis intramitocondriais de ADP, ATP, P_i , NAD^+ e NADH (Nicholls e Ferguson, 2002). Além disso, alguns organismos e tecidos apresentam reguladores específicos de fosforilação oxidativa. Em geral, estas são vias dissipativas que dissociam a oxidação de substratos da síntese de ATP, resultando na liberação de calor (veja Jarmuszkiewicz et al., 2001 para revisão). Um exemplo de via dissipativa são as proteínas desacopladoras, proteínas praticamente ubíquas que estimulam a entrada de prótons para a matriz mitocondrial sem síntese de ATP (revisado por Nicholls e Rial, 1999; Garlid et al., 2000; Klingenberg, 2001; Vercesi, 2001). Essas proteínas estão relacionadas à termogênese e regulação do peso corporal de mamíferos (Giacobino, 2002), e parecem ser importantes para o desenvolvimento e proteção contra estresse oxidativo de plantas e eucariotos unicelulares (Sluse e Jarmuszkiewicz, 2002; Brandalise et al., 2003). Outro exemplo de via dissipativa com função termogênica presente em plantas e fungos é a oxidase alternativa, que desvia elétrons da coenzima Q diretamente para O_2 sem bombear prótons (Jarmuszkiewicz et al., 2001).

Recentemente nós descrevemos uma via dissipativa em mitocôndrias de plantas que ocorre pelo ciclamento de íons K^+ , entrando na mitocôndria por um uniporter putativo e sendo removidos por um trocador K^+/H^+ (Anexo VI). Este uniporter de K^+ em mitocôndrias de plantas apresenta características regulatórias muito distintas do canal mitocondrial de K^+ sensível a ATP encontrado em mamíferos (Anexos I e II), sendo insensível à inibição por ATP ou sulfoniluréias, mas sensível à inibição por quinina. Como resultado de sua atividade, há aumento da liberação de calor da suspensão mitocondrial e prevenção da liberação de EROs (Anexo VI).

Espécies Reativas de Oxigênio Mitocondriais

Diferentes componentes da cadeia respiratória podem converter O_2 a radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) quando reduzidos. Na cadeia respiratória plenamente funcional, isso ocorre com aproximadamente 0,01 a 1% do oxigênio consumido, dependendo das condições fisiológicas e substratos metabolizados (Boveris e Chance, 1973; Korshunov et al., 1997; St-Pierre et al., 2002; Liu et al., 2002; Starkov et al., 2003; veja Anexos VII e IX). O $O_2^{\cdot-}$ originado pela cadeia respiratória pode ser gerado pela NADH desidrogenase (Boveris e Chance, 1973; Turrens e Boveris, 1980), pela coenzima Q (Cadenas et al., 1977; Turrens et al., 1985; Boveris e Chance, 1973, veja Fig. 2) ou, possivelmente, por desidrogenases matriciais (Starkov e Fiskum, 2002). Apesar da citocromo c oxidase ser o local onde é normalmente realizada a transferência de elétrons para o oxigênio, a liberação de $O_2^{\cdot-}$ pela citocromo c

oxidase é surpreendente baixa (Turrens, 1997). Isso se deve à capacidade da citocromo c oxidase de se ligar fortemente aos intermediários de oxigênio parcialmente reduzidos, impedindo seu desligamento antes da redução completa a H_2O .

A geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ ao nível do átomo central de ferro da NADH desidrogenase é de grande importância fisiopatológica, tendo sido correlacionada com danos celulares em distúrbios neurodegenerativos como a doença de Parkinson (revisado por Singer e Ramsay, 1990; Greenameyer et al., 1999; Fiskum et al., 2003). Pode ser estimulada pela presença de substratos respiratórios que geram NADH, como o malato, glutamato e piruvato. A presença de rotenona, um inibidor da transferência de elétrons entre o complexo I e a UQ, também estimula sensivelmente a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pela NADH desidrogenase (Turrens e Boveris, 1980; Turrens, 1997; Starkov et al., 2002; Sousa et al., 2003). É interessante notar que o tratamento de animais de experimentação com rotenona ou 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, outro inibidor do complexo I, leva a uma neuropatia semelhante à doença de Parkinson (Singer e Ramsay, 1990; Betarbet et al., 2000).

A coenzima Q é também um importante sítio de vazamento de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Isso se deve à doação de elétrons da $\text{UQH}^{\cdot-}$ para o oxigênio molecular. O vazamento de elétrons ao nível da coenzima Q é

Fig. 2 – EROs Detectáveis na Mitocôndria e Sistemas Antioxidantes. A cadeia respiratória mitocondrial gera $\text{O}_2^{\cdot-}$, que pode ser dismutado a H_2O_2 pela Mn-superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD), combinado com um próton para gerar $\text{HO}_2^{\cdot}$ ou oxidado a O_2 pelo citocromo c (cit c). O H_2O_2 pode ser detoxificado pela glutathione peroxidase (GP), catalase (cat) ou tiorredoxina peroxidase (TPx). Alternativamente, pode gerar $\text{HO}^{\cdot}$ na presença de Fe^{2+} . $\text{NO}^{\cdot}$ é gerado pela sintase de óxido nítrico mitocondrial (NOS), e pode se combinar com $\text{O}_2^{\cdot-}$, gerando $\text{ONOO}^{\cdot}$.

estimulado por succinato, cianeto e antimicina A (Boveris et al., 1976; Cadenas et al., 1977; Turrens et al., 1985; Turrens, 1997; Kowaltowski et al., 1998). A antimicina A tem um efeito estimulatório notavelmente grande, porque bloqueia a formação de $UQH^{\cdot-}$ na face matricial da membrana mitocondrial interna, promovendo o acúmulo de $UQH^{\cdot-}$ formado anteriormente na face intermembranas. O mixotiazol, um inibidor da formação de $UQH^{\cdot-}$ na face citosólica da membrana mitocondrial interna, previne a formação de $O_2^{\cdot-}$ pela coenzima Q (Turrens et al., 1985; Dawson, 1993; Hansford et al., 1997; Turrens, 1997; Kowaltowski et al., 1998; Starkov e Fiskum, 2001).

Recentemente, relatos de diferenças de geração de $O_2^{\cdot-}$ a partir de substratos que geram NADH sugeriram que desidrogenases da matriz mitocondrial também podem ser fontes de redução monoeletrônica de O_2 (Starkov e Fiskum, 2002). Esta hipótese pode explicar as significativas diferenças observadas na geração de EROs pela mitocôndria a partir de carboidratos e ácidos graxos (St-Pierre et al., 2002).

EROs distintas podem ser detectadas na mitocôndria. O $O_2^{\cdot-}$ pode ser detectado em suspensões de partículas submitocondriais ou através do uso de indicadores permeáveis à mitocôndria como a hidroetidina (Turrens e Boveris, 1980; Turrens et al., 1982; Budd et al., 1997). Em mitocôndrias intactas, sua detecção é dificultada devido a sua baixa difusibilidade e alta reatividade. Provavelmente, a difusão de $O_2^{\cdot-}$ através da membrana mitocondrial ocorre pela combinação de $O_2^{\cdot-}$ e prótons, gerando o radical peridroxil ($HO_2^{\cdot}$, Liu, 1997, veja Fig. 2).

$O_2^{\cdot-}$ pode ser rapidamente dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase intramitocondrial dependente de manganês (MnSOD, para revisão veja Fridovich, 1995) ou pela Cu/ZnSOD do espaço intermembranas (Okado-Matsumoto et al., 2001; Sturtz et al., 2001). Por ser mais estável e difusível que o $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 pode ser detectado com maior facilidade em suspensões mitocondriais (Loschen et al., 1973; Loschen e Azzi, 1975; Boveris et al., 1976; Kowaltowski et al., 1995; Kowaltowski et al., 1996; 1998; Korshunov et al., 1997; St-Pierre et al., 2002; Sousa et al., 2003, Anexos VI-X). Devido a essa propriedade, a detecção de H_2O_2 é freqüentemente usada como indicador de estresse oxidativo mitocondrial.

O H_2O_2 , na presença de Fe^{2+} , gera o radical hidroxil ($HO^{\cdot}$) (Sutton e Winterborn, 1989), um radical extremamente reativo, com meia vida curta (Lubec, 1996), tornando sua detecção em sistemas biológicos muito complexa (Giulivi et al., 1995; Grijalba et al., 1999).

Recentemente, foi descrita uma sintase de óxido nítrico localizada na membrana mitocondrial interna, capaz de gerar óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) através da oxidação de L-arginina (Giulivi et al., 1998; Tatoyan e Guilivi, 1998; Elfering et al., 2002; Lacza et al., 2003; Elfering et al., 2004; Valdez et al., 2004). Sabe-se que $NO^{\cdot}$ pode modular as taxas de respiração e síntese de ATP, pois inibe a citocromo c oxidase (revisado por Giulivi, 2003; Brunori et al., 2004). O $NO^{\cdot}$ pode reagir com $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial, gerando o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Pryor e Squadrito, 1995).

Existem diversas condições que podem alterar a geração mitocondrial de EROs (revisado por Skulachev, 1997; Kowaltowski e Vercesi, 2001). Uma situação de relevância patológica é a alteração da tensão de oxigênio do micro-ambiente mitocondrial. Obviamente, a incubação de mitocôndrias em um ambiente na ausência total de oxigênio (anóxia) previne a formação de EROs. Porém, na presença de baixas concentrações de oxigênio (hipóxia), como ocorre durante a isquemia tecidual (condição em que há parada da perfusão do tecido, com falta de oxigenação e nutrição adequados), a geração mitocondrial de EROs pode tanto se encontrar aumentada como inibida (Costa et al., 1993; Yang e Block, 1995; Delgi Esposti e McLennan, 1998; Vanden Hoek et al., 1998; Waypa e Schumacker, 2002). Em condições hiperóxicas, a geração mitocondrial de EROs é estimulada (Boveris e Chance, 1973; Jamieson et al., 1986). É interessante também mencionar que mitocôndrias incubadas em anóxia e depois suplementadas com oxigênio (uma experimento *in vitro* que simula a isquemia/reperfusão) geram quantidades aumentadas de EROs logo após a reoxigenação (Bolli et al., 1988; 1989; Kowaltowski et al., 1995). Nessas condições, a geração de EROs mitocondriais também pode ser estimulada pelo aumento das concentrações de Ca^{2+} celulares e mitocondriais (Kowaltowski et al., 2001). EROs geradas pela mitocôndria podem ter um papel importante na gênese de lesões teciduais associadas à isquemia/reperfusão (Bolli, 1998; Kristian e Siesjo, 1998; Fiskum et al., 1998; Castilho et al., 1999; Kim et al., 2003; Levraut et al., 2003).

Como consequência do aumento da geração de EROs mitocondriais, podem ocorrer danos oxidativos a ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (revisado por Kowaltowski e Vercesi, 2001). Uma consequência comum do estresse oxidativo mitocondrial na presença de concentrações elevadas de Ca^{2+} é a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna que leva à disfunção da organela, além de liberação de fatores mitocondriais pró-apoptóticos (Kowaltowski et al., 2001). A ocorrência de TPM é um evento iniciador em uma grande diversidade de formas de morte celular, incluindo a pós-isquêmica e algumas formas de apoptose (revisado por Duchon et al., 1993; Zoratti e Szabo, 1995; Kroemer et al., 1995; Lemasters et al., 1998; Crompton, 1999; Halestrap, 1999; Orrenius, 2004).

O citocromo c é também um importante fator regulatório para a liberação de EROs mitocondriais (Zhao e Xu, 2004; Pereverzey et al., 2003). A perda de citocromo c posterior à TPM resulta em aumento da liberação mitocondrial de H_2O_2 (Cai e Jones, 1998), e pode ser um dos principais desencadeadores da morte celular secundariamente a esse processo. Nós demonstramos (Anexo VIII) que a perda de citocromo c leva a um aumento na geração de EROs não só por promover diminuição da velocidade respiratória (Skulachev, 1998), mas também por retirar da mitocôndria uma proteína capaz de receber elétrons de pontos intermediários da cadeia respiratória, evitando sua transferência para o O_2 .

Outra condição que altera a geração mitocondrial de EROs consiste em utilizar um protonóforo para diminuir levemente o potencial de membrana mitocondrial, desacoplando a respiração do potencial de membrana. Nessas

condições, ocorre uma diminuição significativa da geração mitocondrial de EROs (Korshunov et al., 1997; Skulachev, 1997). O desacoplamento mitocondrial pode ser promovido também por ativação de proteínas desacopladoras mitocondriais (Nègre-Salvayre et al., 1997; Kowaltowski et al., 1998), cuja atividade é estimulada por aumentos dos níveis mitocondriais de $O_2^{\cdot -}$ (Murphy et al., 2003; Talbot et al., 2004). Acredita-se que a diminuição da geração de EROs em mitocôndrias ligeiramente desacopladas esteja relacionada ao aumento das taxas de respiração, que reduz o tempo de vida de intermediários reduzidos que doam elétrons para o O_2 . É possível também que o aumento das taxas respiratórias cause uma diminuição na tensão de oxigênio no micro-ambiente mitocondrial, prevenindo assim a formação de $O_2^{\cdot -}$ (Skulachev, 1997).

Nós caracterizamos um mecanismo de desacoplamento mitocondrial leve que envolve a entrada de íons K^+ pelo canal mitocondrial de K^+ sensível a ATP (veja Fig. 3 e texto abaixo) e remoção destes íons pelo trocador K^+/H^+ . O funcionamento conjunto destes canais, apesar de reduzir o potencial de membrana em menos de 10 mV (Anexo II), é capaz de diminuir a liberação de H_2O_2 mitocondrial em até 30% (Anexo IX). Este é um mecanismo extremamente interessante de regulação da geração mitocondrial de EROs porque tem efeito muito limitado sobre a fosforilação oxidativa, e é a primeira via dissipativa descrita com reguladores farmacológicos bem estabelecidos.

Transporte Mitocondrial de K^+

Quando descreveu a teoria quimiosmótica, Mitchell (1961) previu o vazamento de K^+ , o cátion intracelular mais abundante, para o interior da mitocôndria, pois o gradiente de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons é um forte estímulo para a passagem de cátions pela membrana mitocondrial interna. Sabe-se que este vazamento de K^+ é estimulado pelo gradiente de prótons e limitado pela barreira energética da passagem de um íon pela membrana (Garlid e Paucek, 2003). No caso da membrana mitocondrial interna, a dificuldade de vazamento de cátions é extremamente alta, provavelmente por causa do alto conteúdo de cardiolipina (Daum, 1985). Deste modo, o vazamento de K^+ é lento o suficiente para não inviabilizar a fosforilação oxidativa.

Fig. 3 – Transporte de K^+ pelas membranas mitocondriais

Apesar do vazamento de K^+ ser lento, este processo é contínuo, e o acúmulo de K^+ com tempo levaria a um aumento do volume da matriz mitocondrial, porque é acompanhado da entrada eletroneutra de íons fosfato pelo trocador P_i/OH^- (Wohlrab, 1980). Para compensar este aumento de volume, a mitocôndria possui trocadores K^+/H^+ que removem K^+ da matriz às custas do potencial de prótons (Garlid, 1980; Kakr et al., 1989, Fig. 3). Os mecanismos de regulação da atividade do trocador de K^+/H^+ ainda são pouco

conhecidos, mas podem envolver *stretch receptors* ou alterações da concentração de Mg^{2+} intramitocondrial provocadas pela diluição da matriz (veja Garlid e Paucek, 2003 para revisão).

Por causa do efeito desacoplador da entrada de K^+ na matriz mitocondrial, não se esperaria haver um mecanismo regulado de entrada deste íon na mitocôndria. Porém, estudos na década de 80 (Mironova et al., 1981; Chang e Diwan, 1982) sugeriram a existência de transportadores de K^+ em membranas mitocondriais. Infelizmente, nestes trabalhos não foi possível caracterizar estes transportadores, nem eliminar a possibilidade que fossem proteínas contaminantes não mitocondriais. Somente em 1991, Inoue et al. demonstraram que mitocôndrias isoladas de mamíferos possuem um canal que transporta K^+ de maneira sensível a ATP (mitoK_{ATP}) na membrana interna, trazendo maior suporte à existência de canais de K^+ mitocondriais. Esse canal sensível a ATP foi isolado e reconstituído em lipossomos por Paucek et al. (1992), e estudos iniciais de sua estrutura sugerem que possui grande semelhança com o canal de K^+ sensível a ATP da membrana plasmática.

Apesar da aparente semelhança estrutural, o mitoK_{ATP} apresenta uma resposta diferenciada à ativação por drogas em relação a canais da membrana plasmática. Como exemplo, o mitoK_{ATP} é cerca de 2000 vezes mais sensível à abertura por diazóxido, e é inibido especificamente por 5-hidroxicanoato (Garlid et al., 1996; Jaburek et al., 1998). Graças às diferentes sensibilidades a drogas, é possível atribuir efeitos *in vivo* de medicamentos que abrem ou fecham canais de K^+ à proteína plasmática ou mitocondrial. Através do uso de diazóxido e 5-hidroxicanoato, verificou-se que a forte proteção isquêmica cardíaca promovida por drogas que abrem canais de K^+ se deve à abertura do canal mitocondrial (Garlid et al., 1997, veja discussão abaixo).

Parte dos objetivos do nosso grupo de pesquisa tem sido a caracterização das consequências funcionais da ativação do mitoK_{ATP}. Nós

Fig. 4 - Função da cadeia de transporte de elétrons, ATP sintase, trocador ATP/ADP e captação de Ca^{2+} mitocondrial em condições fisiológicas (esquerda), isquêmicas (centro) e isquêmicas na presença do mitoK_{ATP} aberto (direita).

quantificamos o transporte de K^+ através destes canais em mitocôndrias de coração (Anexo I), cérebro (Anexo II) e rim (Anexo XI). Em todos esses tecidos, o transporte de K^+ ATP-sensível é limitado ($30-170 \text{ nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) e incapaz de diminuir o potencial de membrana em mais de 10 mV. Isso significa que este canal não pode agir significativamente como um regulador de velocidade respiratória ou potencial de prótons. De fato, seus principais efeitos parecem ser sobre a regulação de volume (Anexos I, II e XI) e a geração de EROs (Anexo IX).

A regulação do volume mitocondrial pode ser um importante fator no efeito protetor contra danos isquêmicos da abertura deste canal. Durante a isquemia, a falta de oxigênio resulta na perda de bombeamento de prótons pela cadeia de transporte de elétrons. No coração, que é pobre em subunidades inibitórias de ATP sintase (Rouslin e Broge, 1996), pode ocorrer inversão da reação catalisada por esta enzima, com hidrólise de ATP e bombeamento fútil de prótons (Fig. 4). Esta atividade acaba depletando mais rapidamente as reservas energéticas do tecido. Nós demonstramos que o inchamento mitocondrial osmótico (Anexo III) ou pela ativação de mitoK_{ATP} (Anexos III, IV e XI) diminui a hidrólise de ATP por mitocôndrias em condições em que não há respiração (veja Figs. 4, 5). Este efeito pode ser devido à diminuição do espaço intermembranas secundário ao inchamento mitocondrial, um efeito que altera a interação do VDAC com proteínas do espaço intermembranas e membrana interna, diminuindo sua permeabilidade a ATP e ADP (Gellerich et al., 1993).

Uma segunda consequência da limitação da hidrólise de ATP em mitocôndrias isquêmicas é a geração de um potencial de membrana menor, que permite uma menor captação de Ca^{2+} (Anexo IV, Fig. 4), e pode evitar consequências indesejáveis desta captação excessiva, como a TPM. A TPM nessas condições também pode ser prevenida pela limitação da geração de EROs promovida pela abertura do mitoK_{ATP} (Anexo IX). Deste modo, a proteção isquêmica promovida por agonistas do mitoK_{ATP} como o diazóxido (DZX) ocorre por vários efeitos inter-relacionados secundários à abertura deste canal (ver Fig. 5).

É interessante notar que, apesar de ter características farmacológicas e fisiológicas bem determinadas, o mitoK_{ATP} ainda não tem estrutura conhecida. O seu seqüenciamento tem sido dificultado pela baixa abundância, de cerca de uma cópia por mitocôndria (Anexos I e II). No entanto, estudos com a proteína parcialmente purificada sugerem que seja composta por quatro subunidades de 55 kDa que formam um canal de K^+ (mitoKIR) e quatro subunidades de 63 kDa que formam o receptor de sulfoniluréia (mitoSUR, Paucek et al., 1992; Garlid e Paucek, 2003). Esta estrutura é semelhante à de canais de K^+ sensíveis a ATP da membrana plasmática. As diferenças na regulação fisiológica e farmacológica sugerem que pelo menos o mitoSUR seja exclusivamente mitocondrial, pois responde a baixas concentrações de diazóxido e promove fechamento, e não abertura, do canal na presença de ADP (para revisão, veja Garlid e Paucek, 2003).

Fig. 5 – Mecanismos através dos quais a abertura do mitoK_{ATP} com DZX pode prevenir a morte celular isquêmica.

Isquemia, Reperfusão e Pré-Condicionamento Cardíaco

Como dito anteriormente, a isquemia consiste na perda de aporte de sangue a um tecido, resultando em falta de oxigenação e nutrição adequados. Ocorre em diversas condições patológicas, sendo uma das condições mais incidentes o infarto cardíaco. Nesta condição, ocorre dano celular grave, com necrose generalizada na área central, onde o aporte de nutrientes foi interrompido completamente e por longo tempo, inviabilizando o metabolismo oxidativo. Nas áreas adjacentes (áreas cinzentas ou de penumbra), ocorre um dano menos severo, caracterizado por morte celular necrótica e/ou apoptótica. Este dano frequentemente é observado após o re-estabelecimento da

circulação sangüínea (reperfusão), indicando que há processos lesivos relacionados também ao re-establishimento do metabolismo oxidativo (para revisão, veja Jennings e Reimer, 1991).

A participação da mitocôndria em lesões cardíacas promovidas por isquemia/reperfusão é multifatorial. Durante a isquemia, a falta de fosforilação oxidativa e função inversa da ATP sintase levam à diminuição dos níveis intracelulares de ATP, aceleração da glicólise e acidificação (Fig. 5, Anexo IV, Jennings e Reimer, 1991; Rouslin et al., 1995; Di Lisa et al., 1998). Há também perda da homeostase de Ca^{2+} , por falta de ATP (Nayler, 1981). Pode também haver aumento da geração de EROs (Delgi Esposti e McLennan, 1998; Becker et al., 1999). Após a reperfusão, há um aumento maciço de EROs geradas (Bolli et al., 1988; Vanden Hoek et al., 1996), levando a danos oxidativos celulares (para revisão veja Kowaltowski e Vercesi, 1999; Kowaltowski et al., 2001). O grupo do Prof. Halestrap (Griffiths e Halestrap, 1993; Griffiths e Halestrap, 1995) mostrou a ocorrência de TPM após a reperfusão cardíaca através de estudos farmacológicos e medidas do volume e integridade mitocondriais.

Em 1986, Murry et al. fizeram uma descoberta surpreendente: corações submetidos a um período curto de isquemia (5 min) sofriam uma lesão menor quando eram posteriormente submetidos a um período isquêmico mais longo (40 min), se comparados a corações em que não houve o período curto de isquemia. Esse período curto de isquemia cardíaca não lesiva foi denominado pré-condicionamento cardíaco. Estudos posteriores comprovaram que o pré-condicionamento também é eficaz na prevenção de danos isquêmicos em outros órgãos, como cérebro e rim (Bonventre, 2002; Reis et al., 1997).

O mecanismo pelo qual o pré-condicionamento determina uma menor lesão isquêmica ainda é motivo de intensa investigação. Sabe-se que os efeitos do pré-condicionamento podem ser prevenidos pela presença de inibidores de proteína kinase C (Ytrehus et al., 1994) e também por antioxidantes (Chen et al., 1995). Sabe-se também que corações tratados com agonistas adrenérgicos ou oxidantes são protegidos contra danos isquêmicos (Yao e Gross, 1993; Vanden Hoek et al., 1998), sugerindo que o pré-condicionamento envolve sinalização por EROs e proteínas quinases. Reguladores de morte celular apoptótica, como o Bcl-2 e Bid (Maulik et al., 1999; Nakamura et al., 2000, veja abaixo) também têm sua distribuição e expressão alterada pelo pré-condicionamento, o que indica que o pré-condicionamento pode inibir não só a morte celular necrótica, típica da área central do enfarte, como também a morte celular apoptótica, que ocorre na área periférica (Saraste et al., 1997). A alteração de expressão e localização intracelular destes mediadores de morte celular pode também explicar porque, além de inibir lesões cardíacas que ocorrem imediatamente após pré-condicionamento, este processo é capaz de prevenir danos isquêmicos ~24 horas após o pré-condicionamento (pré-condicionamento tardio – Kuzuya et al., 1993).

Também foi comprovado que inibidores do mitoK_{ATP} como o 5-hidrodecanoato previnem os efeitos protetores do pré-condicionamento

isquêmico (Schultz et al., 1997). Este fato, somado à observação que a abertura do mitoK_{ATP} é cardioprotetora (Garlid et al., 1997) sugere que o pré-condicionamento isquêmico leva à abertura do mitoK_{ATP}, e que a abertura deste canal seja protetora contra a isquemia.

Nosso grupo identificou vários efeitos citoprotetores da abertura do mitoK_{ATP} durante a isquemia/reperfusão (veja Figs 4 e 5). A diminuição da hidrólise de ATP (Anexos III e IV) leva a maiores níveis teciduais de compostos fosfoados ricos em energia (Anexo IV). A diminuição da captação excessiva de Ca²⁺ (Anexo IV) pode prevenir a TPM (Hausenloy et al., 2004). Finalmente, a prevenção da geração de EROs mitocondriais (Anexo IX) pode diminuir lesões oxidativas pós-isquêmicas. Esta última função do mitoK_{ATP} é ainda bastante discutida, pois alguns grupos sugerem que a abertura do mitoK_{ATP} possa aumentar, e não diminuir a geração mitocondrial de EROs (Carroll et al., 2001; Forbes et al., 2001; Krenz et al., 2002). Porém, o mecanismo pelo qual este

Fig. 6 – Sequência de eventos que levam à proteção isquêmica após o pré-condicionamento.

aumento ocorreria não é bem justificado, e a hipótese é baseada em dados experimentais contestáveis pela falta de realização de controles adequados e uso de indicadores inespecíficos (veja revisão crítica em Gross, 2003).

Nós também nos dedicamos ao estudo dos mecanismos pelos quais o pré-condicionamento pode levar à ativação do mitoK_{ATP} (Anexo X, veja Fig. 6). Verificamos que períodos curtos de isquemia levam a uma pequena inibição do Complexo I, que resulta em uma produção aumentada de EROs. Estas EROs levam à ativação do mitoK_{ATP}, por oxidação direta ou secundariamente à ativação de quinases (Zhang et al., 2001). O mitoK_{ATP} realiza então os efeitos cardioprotetores finais discutidos acima.

Os nossos resultados sobre os mecanismos envolvidos no pré-condicionamento isquêmico obtidos utilizando corações de rato perfundidos e mitocôndrias isoladas são bastante concordantes com os resultados do grupo de Schumacker e colaboradores, que estudam pré-condicionamento em cardiomiócitos de frangos recém-nascidos. Este grupo verificou que há um aumento leve de EROs mitocondriais leve durante o pré-condicionamento, que previne o substancial aumento de EROs pós-reperusão (Vanden Hoek et al., 1998). Agonistas do mitoK_{ATP} também previnem EROs pós-reperusão (Vanden Hoek et al., 2000), e a presença de antioxidantes durante o pré-condicionamento evita seus efeitos cardioprotetores (Lebuffe et al., 2003). Como os efeitos protetores do pré-condicionamento também foram prevenidos por inibidores de NO[•] sintases, estes autores sugerem que a sinalização durante o pré-condicionamento cardíaco envolve também espécies reativas de nitrogênio (Lebuffe et al., 2003).

Proteínas Mitocondriais Pró- e Anti-Apoptóticas

Além de participar da morte celular necrótica, a forma predominante de perda celular após a isquemia/reperusão, a mitocôndria também participa da apoptose, uma morte celular altamente regulada e dependente de energia (revisado por Tomei e Umansky, 2001). A participação da mitocôndria na apoptose foi inicialmente demonstrada através de experimentos que indicaram que o citocromo c, componente do espaço intermembranas mitocondrial, era essencial para a indução de apoptose (Liu et al., 1996). O translocamento do citocromo c do espaço intermembranas para o citosol é característica das fases iniciais da apoptose, e leva à ativação de caspases, que promovem então a clivagem do DNA nuclear e a apoptose (Liu et al., 1996; Cai et al., 1998; Gottlieb, 2000).

Logo após a caracterização da participação do citocromo c na apoptose, Kroemer e colaboradores descobriram uma segunda proteína do espaço intermembranas mitocondrial que induzia apoptose quando introduzida no citosol (Susin et al., 1996). Essa flavoproteína de 57 kDa, chamada de Fator Indutor de Apoptose (FIA), leva a características apoptóticas em núcleos isolados mesmo na ausência de caspases (Susin et al., 1999).

Hoje, sabe-se que a mitocôndria contém vários compostos que regulam a morte celular. A pró-caspase 9 é liberada de mitocôndrias durante a apoptose. No citosol, é clivada e participa da composição do apoptossomo, que media a clivagem de caspase 3, responsável pela clivagem de DNA, de modo ativado por citocromo c (Krajewski et al., 1999; Zou et al., 1999). A Smac/Diablo, também presente na mitocôndria antes da ativação do processo apoptótico, se liga a proteínas inibitórias de apoptose quando liberada para o citoplasma, aumentando a probabilidade de ocorrer ativação de caspases (Du et al., 2000; Ekert et al., 2001).

Após o reconhecimento do papel regulador da mitocôndria na apoptose, foram identificados mecanismos de controle da liberação de fatores pró-apoptóticos pela organela. Nesse papel regulatório, destacam-se as proteínas da família do Bcl-2 (Adams e Cory, 1998; Reed, 1998; Gottlieb, 2000; Tsujimoto e Shimizu, 2000). O Bcl-2 foi inicialmente identificado em linfomas, e associado à resistência à quimioterapia (Miyashita and Reed, 1992). Posteriormente, verificou-se que o Bcl-2 se expressa em tumores de várias origens. Essa proteína é mitocondrial, provavelmente restrita à membrana externa (Monaghan et al., 1992; Nakai et al., 1993). A presença do Bcl-2 inibe a liberação de FIA e citocromo c pela mitocôndria, evitando assim a ativação de caspases e morte celular apoptótica (Susin et al., 1996; Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997). O mecanismo pelo qual o Bcl-2 inibe a liberação de fatores mitocondriais é controverso, e aparentemente envolve múltiplos pontos de regulação (veja discussão abaixo).

Além do Bcl-2, outras proteínas da mesma família atuam na regulação da liberação de fatores mitocondriais apoptogênicos, dentre eles a BAX, Bcl-xL, BIM, BAD e BID (Adams e Cory, 1998). Algumas das proteínas dessa família têm atividade pró-apoptótica, sendo a BAX, BAD e BID as mais estudadas. A BAX é expressa em células saudáveis e normalmente se encontra no citosol. Quando ocorre um estímulo apoptótico, a BAX se transloca do citoplasma para a mitocôndria junto com a forma ativa de BID, um evento que coincide com a liberação mitocondrial de citocromo c (Skulachev, 1998; Adams e Cory, 1998; Polster et al., 2001). Não são bem estabelecidos os mecanismos pelos quais a BAX promove a liberação de citocromo c, mas sabe-se que a presença de Bcl-2 inibe esse processo.

Para poder estabelecer os mecanismos de regulação por Bcl-2 da liberação de citocromo c e FIA, procurou-se compreender como essas proteínas são liberadas do espaço intermembranas mitocondrial para o citoplasma. Esses estudos geraram grande discussão na literatura, e hoje parece haver um consenso de que não há um mecanismo único para a liberação de citocromo c e FIA da mitocôndria. Um fenômeno conhecido pelo qual ocorre liberação de citocromo c e FIA é a TPM. Na TPM, a oxidação de proteínas da membrana mitocondrial interna leva à formação de um poro não seletivo, de alta condutividade, causando a entrada de eletrólitos e água para a matriz mitocondrial, resultando em inchamento coloidosmótico da organela (revisado por Zoratti e Szabo, 1995). Esse inchamento provoca a ruptura da membrana mitocondrial externa, com liberação de citocromo c e FIA para o citosol. O Bcl-2 inibe a TPM indiretamente, por aumentar o poder redutor da

mitocôndria e prevenir a lesão oxidativa (Kowaltowski et al., 2000). A BAX pode provocar a TPM, por mecanismos ainda não determinados (Pastorino et al., 1998; Narita et al., 1998).

Apesar de ser bem comprovado que o citocromo c e FIA podem ser liberados pela mitocôndria devido à TPM, parece pouco lógico supor que o mecanismo principal de liberação desses componentes do espaço intermembranas seja a permeabilização da membrana interna, que, além de romper a membrana externa, também compromete a funcionalidade da mitocôndria e diminui a oferta celular de ATP, essencial à apoptose. Também não é claro como a BAX, que se localiza na membrana externa, regula a TPM. De fato, comprovou-se que a liberação de citocromo c pode ocorrer apenas devido a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, como ocorre quando a BAX se insere nessa membrana de modo estimulado por BID truncado (Shimizu et al., 1999; Polster et al. 2001). Essa interação da BAX com a membrana externa é inibida por Bcl-2 e outras proteínas anti-apoptóticas similares, como a Bcl-xL (Shimizu et al., 1999; Polster et al. 2001). Hoje, acredita-se que a apoptose programada (aquela prevista pelo ciclo celular) ocorre devido à permeabilização da membrana externa, enquanto a apoptose acidental (que se segue a estímulos necróticos mais brandos, como nas áreas cinzentas/penumbra do infarto cardíaco) pode ser desencadeada pela TPM, desde que ela ocorra apenas em uma fração das mitocôndrias (Crompton, 1999).

Para estudar os efeitos do Bcl-2 é comum utilizar células transfectadas com o gene *bcl-2*, que expressam a proteína em quantidades aumentadas. Várias linhagens celulares hiperexpressando Bcl-2 foram criadas, e notou-se que elas têm características diferentes das células controle (transfectadas com vírus sem o gene). Uma característica marcante dessas células é possuir maior quantidade de compostos antioxidantes, ou de apresentar menor lesão quando expostas a estresse oxidativo (Hockenbery et al., 1993, Kane et al., 1993, Ellerby et al., 1996). Essa característica está de acordo com trabalhos que sugerem um papel importante de EROs na regulação da apoptose (Sarafian e Bredesen, 1994; Voehringer, 1999; Chandra et al., 2000). Também é condizente com estudos que comprovam que proteínas da família Bcl-2 inibem morte celular não-apoptótica secundária a estresse oxidativo (Anexo VII).

Numa tentativa de entender melhor os efeitos redox da hiperexpressão do Bcl-2, nós realizamos experimentos determinando seus efeitos bioenergéticos e o resultado sobre a geração mitocondrial de EROs (Anexos V e VII). Para avaliar os efeitos bioenergéticos da hiperexpressão de Bcl-2, comparamos a respiração, potenciais de membrana, ΔpH e concentrações intramitocondriais de K^+ em linhagens celulares Bcl-2- e Bcl-2+ (Anexo V). Trabalhos anteriores de nosso grupo e outros (Shimizu et al., 1998; Kowaltowski et al., 2000) sugeriam que Bcl-2 promove um aumento do potencial de membrana mitocondrial, mas notamos que esta diferença não era real. Havia uma diferença de resposta a indicadores de potencial de membrana mitocondrial que, quando normalizada, indicava valores de potencial de membrana idênticos na presença ou ausência de Bcl-2. Surpreendentemente, as células Bcl-2+ apresentavam diferenças em resposta a todos os indicadores

usados no trabalho, o que nos levou a suspeitar que houvesse alterações estruturais nessas mitocôndrias. Esta hipótese foi confirmada através de análise de tamanho de partículas e espalhamento lateral de luz de mitocôndrias individuais por citometria de fluxo, que indicou a presença de organelas maiores e mais complexas quando hiperexpressam Bcl-2.

No momento, estamos realizando uma colaboração com o Prof. Carmen A. Mannella (Wadsworth Institute, Albany, USA) para realizar tomografias por microscopia eletrônica (Frey e Mannella, 2000) para identificar as alterações estruturais específicas promovidas por Bcl-2. Apesar de ainda não serem precisamente identificadas, tais alterações não são completamente inesperadas. Pelo menos uma proteína da família Bcl-2, o BID, promove alterações da estrutura das cristas mitocondriais e da relação entre membrana interna e externa (Scorrano et al., 2002). A presença de mitocôndrias maiores também fornece uma explicação para a presença de maior quantidade de compostos solúveis na matriz como NADH (Ellerby et al., 1996; Kowaltowski et al., 2000), apesar de não haver mudança na velocidade e acoplamento respiratório (Anexo V).

Outra característica surpreendente das mitocôndrias transfectadas com Bcl-2 e também Bcl-xL e Mcl-1, duas proteínas antiapoptóticas da mesma família (Adams e Cory, 2001), é a liberação de maiores quantidades de EROs (Degli Esposti et al., 1999; Anexo VII, ver Fig. 7). Este efeito aparentemente paradoxal de proteínas que protegem contra a morte celular se deve a alterações do metabolismo de NADH, possivelmente devido a sua maior quantidade. Pudemos comprovar que esta geração crônica de EROs em quantidades maiores pela cadeia respiratória mitocondrial leva a um aumento da capacidade de remover H_2O_2 destas células. Se a geração aumentada de

Fig. 7 – Mecanismos pelos quais Bcl-2 pode proteger contra a morte celular.

EROs é prevenida pelo uso de baixas concentrações de desacopladores mitocondriais no meio de cultura, as células, mesmo expressando essas proteínas, perdem sua resistência contra dano celular oxidativo (Anexo VII). Deste modo, propomos que a hiperexpressão de Bcl-2 e proteínas semelhantes protege não só contra a morte celular apoptótica, mas também contra a morte celular necrótica oxidativa, porque aumenta o poder redutor destas células (Fig. 7). Este efeito protetor contra morte celular necrótica pode ser essencial para a sobrevivência de tumores sólidos que expressam essas proteínas, pois estes tecidos são submetidos a tensões muito variáveis de oxigênio que, presumivelmente, podem levar a estresse oxidativo.

Considerações Finais

É bem estabelecido que a mitocôndria tem um papel regulatório no metabolismo energético e oxidativo, sendo assim essencial para a manutenção da viabilidade celular. O conjunto de trabalhos exposto nesta tese contribui para a compreensão dos mecanismos pelos quais a função mitocondrial pode afetar a sobrevivência da célula. Dentre esses mecanismos, se destacam:

1. A regulação do metabolismo energético durante a isquemia em coração, cérebro e rim por canais de K^+ , impedindo a perda de ATP por hidrólise mitocondrial (Anexos I-IV e XI).
2. A regulação da geração de EROs mitocondriais por canais de K^+ , a primeira descrição de uma via de regulação desta geração com agonistas e antagonistas farmacológicos conhecidos (Anexos VI e IX).
3. A descrição de uma nova via dissipativa em plantas envolvendo ciclamento de K^+ , que leva à liberação de calor e previne a geração de EROs (Anexo VI).
4. A prevenção da liberação de EROs mitocondriais por citocromo c, componente da cadeia respiratória e sinalizador na apoptose (Anexo VIII).
5. A alteração da estrutura mitocondrial promovida por proteínas da família Bcl-2 (Anexo V).
6. A prevenção de danos teciduais oxidativos através de sinalização redox. Pré-condicionamento cardíaco ou expressão de proteínas da família Bcl-2 levam a aumentos pequenos da geração de EROs que induzem respostas celulares protetoras (Anexos VII e X).

Esperamos que os dados acumulados nessa área auxiliem na definição de abordagens para prevenir a morte celular indesejada, como àquela que ocorre após a isquemia, e evitar a sobrevivência celular indesejada, como a que ocorre em doenças proliferativas e auto-imunes.

Referências

- Adams JM, Cory S (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* 26:61-6.
- Atamna H, Walter PB, Ames BN (2002) The role of heme and iron-sulfur clusters in mitochondrial biogenesis, maintenance, and decay with age. *Arch Biochem Biophys.* 397:345-53.
- Barja G (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* 31:347-66.
- Beavis AD, Brannan RD, Garlid KD (1985) Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. I. A structural interpretation of the relationship between light scattering and matrix volume. *J Biol Chem.* 260:13424-33.
- Becker LB, Vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT (1999) Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol.* 277:H2240-6.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 3:1301-6.
- Bolli R (1998) Causative role of oxyradicals in myocardial stunning: a proven hypothesis. A brief review of the evidence demonstrating a major role of reactive oxygen species in several forms of postischemic dysfunction. *Basic Res Cardiol.* 93:156-62.
- Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB (1988) Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest.* 82:476-85.
- Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, McCay PB (1989) Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res.* 65:607-22.
- Bonventre JV (2002) Kidney ischemic preconditioning. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 11:43-8.
- Boveris A (1977) Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol.* 78:67-82.
- Boveris A, Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* 54:311-4.
- Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134:707-16.
- Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 156:435-44.
- Brandalise M, Maia IG, Borecky J, Vercesi AE, Arruda P (2003) Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr.* 35:203-9.
- Brunori M, Giuffrè A, Forte E, Mastronicola D, Barone MC, Sarti P (2004) Control of cytochrome c oxidase activity by nitric oxide. *Biochim Biophys Acta.* 1655:365-71.
- Budd SL, Castilho RF, Nicholls DG (1997) Mitochondrial membrane potential and hydroethidine-monitored superoxide generation in cultured cerebellar granule cells. *FEBS Lett.* 415:21-24.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:269-90.
- Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 29:222-30.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AOM (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.
- Cai J, Jones DP (1998) Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem.* 273:11401-4.
- Cai J, Yang J, Jones DP (1998) Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta.* 1366:139-49.

- Carroll R, Gant VA, Yellon DM (2001) Mitochondrial K_{ATP} channel opening protects a human atrial-derived cell line by a mechanism involving free radical generation. *Cardiovasc Res.* 51:691-700.
- Castilho RF, Ward MW, Nicholls DG (1999) Oxidative stress, mitochondrial function, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 72:1394-401.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 29:323-33.
- Chang HS, Diwan JJ (1982) K⁺ transport in mitoplasts. *Biochim Biophys Acta.* 681:220-5.
- Chen W, Gabel S, Steenbergen C, Murphy EA (1995) redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic preconditioning in perfused rat heart. *Circ Res.* 77:424-9.
- Colombini M (1987) Regulation of the mitochondrial outer membrane channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr.* 19:309-20.
- Costa LE, Llesuy S, Boveris A (1993) Active oxygen species in the liver of rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Am J Physiol.* 264:1395-1400.
- Coultas L, Strasser A (2003) The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol.* 13:115-23.
- Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 341:233-49.
- Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell.* 116:205-19.
- Daum G (1985) Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 822:1-42.
- Dawson TL, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ (1993) Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 264:961-67.
- Degli Esposti M, McLennan H (1998) Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobiosis: relevance to ceramide-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 430:338-42.
- Degli Esposti M, Hatzinisiriou I, McLennan H, Ralph S (1999) Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes. *J Biol Chem.* 274:29831-7.
- Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Petronilli V (1998) The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim Biophys Acta.* 1366:69-78.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102:33-42.
- Duchen MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M (1993) On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 27:1790-4.
- Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, Verhagen AM, Vaux DL (2001) DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J Cell Biol.* 152:483-90.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 277:38079-86.
- Elfering SL, Haynes VL, Traaseth NJ, Ettl A, Giulivi C (2004) Aspects, mechanism, and biological relevance of mitochondrial protein nitration sustained by mitochondrial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286:H22-9.
- Ellerby LM, Ellerby HM, Park SM, Holleran AL, Murphy AN, Fiskum G, Kane DJ, Testa MP, Kayalar C, Bredesen DE (1996) Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J Neurochem.* 67:1259-67.
- Fiskum G, Murphy AN, Beal MF (1998) Mitochondria in neurodegeneration. Part II: Acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cerebr Flow Met.* 19:351-69.
- Fiskum G, Starkov A, Polster BM, Chinopoulos C (2003) Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 991:111-9.
- Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E (2001) Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res.* 88:802-9.
- Frey TG, Mannella CA (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 25:319-24.

- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64:97-112.
- Garlid KD (1980) On the mechanism of regulation of the mitochondrial K^+/H^+ exchanger. *J Biol Chem.* 255:11273-9.
- Garlid KD, Beavis AD (1985) Swelling and contraction of the mitochondrial matrix. II. Quantitative application of the light scattering technique to solute transport across the inner membrane. *J Biol Chem.* 260:13434-41.
- Garlid KD, Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the K^+ cycle. *Biochim Biophys Acta.* 1606:23-41.
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA (1996) The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem.* 271:8796-9.
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.* 81:1072-82.
- Garlid KD, Jaburek M, Jezek P, Varecha M (2000) How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim Biophys Acta.* 1459:383-9.
- Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta.* 1606:1-21.
- Gellerich FN, Khuchua ZA, Kuznetsov AV (1993) Influence of the mitochondrial outer membrane and the binding of creatine kinase to the mitochondrial inner membrane on the compartmentation of adenine nucleotides in the intermembrane space of rat heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1140:327-34.
- Giacobino JP (2002) Uncoupling proteins, leptin, and obesity: an updated review. *Ann N Y Acad Sci.* 967:398-402.
- Giulivi C (2003) Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med.* 34:397-408.
- Giulivi C, Boveris A, Cadenas EA (1995) Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxylguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys.* 316:909-16.
- Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 273:11038-43.
- Gottlieb RA (2000) Mitochondria: execution central. *FEBS Lett.* 482:6-12.
- Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE (1999) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp.* 66:85-97.
- Griffiths EJ, Halestrap AP (1993) Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 25:1461-9.
- Griffiths EJ, Halestrap AP (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 307:93-8.
- Grijalba MT, Vercesi AE, 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 the respiratory chain. *Biochemistry.* 38:13279-87.
- Gross GJ (2000) The role of mitochondrial K_{ATP} channels in cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* 95:280-4.
- Gross GJ (2003) Selective ATP-sensitive potassium channel openers: fact or fiction. *J Mol Cell Cardiol.* 35:1005-7.
- Gunter TE, Gunter KK (2001) Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. *IUBMB Life.* 52:197-204.
- Halestrap AP (1999) The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp.* 66:181-203.
- Halliwell B, Gutteridge MC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3ª edição, Oxford University Press, New York, USA.
- Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V (1997) Dependence of H_2O_2 formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* 29:89-95.

- Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, Duchon MR (2004) Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. [Epub ahead of print].
- Hertsens RC, Jacob WA (1987) Freeze-fracture study of heart mitochondria in the condensed or orthodox state. *Biochim Biophys Acta*. 894:507-14.
- Hess ML, Manson NH (1984) Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 16:969-85.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 75:241-51.
- Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*. 352:244-7.
- Jaburek M, Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Garlid KD (1998) State-dependent inhibition of the mitochondrial KATP channel by glyburide and 5-hydroxydecanoate. *J Biol Chem*. 273:13578-82.
- Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A (1986) The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol*. 48:703-19.
- Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Vercesi AE, Sluse FE (2001) Alternative oxidase and uncoupling protein: thermogenesis versus cell energy balance. *Biosci Rep*. 21:213-22.
- Jennings RB, Reimer KA (1991) The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*. 42:225-46.
- Kakar SS, Mahdi F, Li XQ, Garlid KD (1989) Reconstitution of the mitochondrial non-selective Na⁺/H⁺ (K⁺/H⁺) antiporter into proteoliposomes. *J Biol Chem*. 264:5846-51.
- Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*. 262:1274-7.
- Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ (2003) Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med*. 3:527-35.
- Klingenberg M (2001) Uncoupling proteins-how do they work and how are they regulated. *IUBMB Life*. 52:175-9.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 275:1132-6.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 416:15-8.
- Kowaltowski AJ (2000) Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Braz J Med Biol Res*. 33:241-50.
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 26:463-71.
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE (2001) Reactive oxygen generation by mitochondria. Em: *Mitochondria in Pathogenesis*, J.J. Lemasters e A.-L. Nieminen, eds. Plenum Publishing Corporation, New York, E.U.A., pp. 281-300.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (1995) Ca²⁺-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *Am J Physiol*. 269:C141-7.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (1996) Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett*. 378:150-152.
- Kowaltowski AJ, Costa ADT, Vercesi AE (1998) Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Lett*. 425:213-6.
- Kowaltowski AJ, Vercesi AE, Fiskum G (2000) Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. *Cell Death Differ*. 7:903-10.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*. 495:12-5.

- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC (1999) Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:5752-7.
- Krenz M, Oldenburg O, Wimpee H, Cohen MV, Garlid KD, Critz SD, Downey JM, Benoit JN (2002) Opening of ATP-sensitive potassium channels causes generation of free radicals in vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*. 97:365-73.
- Kristian T, Siesjö BK (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29:705-18.
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*. 9:1277-87.
- Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M (1993) Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res*. 72:1293-9.
- Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, Horvath EM, Figueroa JP, Szabo C, Busija DW (2003) Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med*. 35:1217-28.
- Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, Anderson T, Iwase H, Vanden Hoek TL (2003) ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284:H299-308.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 1366:177-96.
- Levrault J, Iwase H, Shao ZH, Vanden Hoek TL, Schumacker PT (2003) Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284:H549-58.
- Liu SS (1997) Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. *Biosci Rep*. 17:259-72.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86:147-57.
- Liu Y, Sato T, Seharaseyon J, Szewczyk A, O'Rourke B, Marban E (1999) Mitochondrial ATP-dependent potassium channels. Viable candidate effectors of ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci*. 874:27-37.
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*. 80:780-7.
- Loschen G, Azzi A (1975) On the formation of hydrogen peroxide and oxygen radicals in heart mitochondria. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*. 7:3-12.
- Loschen G, Azzi A, Flohe (1973) Mitochondrial H₂O₂ formation: relationship with energy conservation. *FEBS Lett*. 33:84-7.
- Lubec G (1996) The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *J Investig Med*. 44:324-46.
- Mannella CA, Parsons DF (1977) Small-angle X-ray scattering from mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 470:242-50.
- Martin W, Muller M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*. 392:37-41.
- Mattson MP, Kroemer G (2003) Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med*. 9:196-205.
- Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton D, Das DK (1999) Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation*. 100:II369-75.
- Mironova GD, Fedotcheva NI, Makarov PR, Pronevich LA, Mironov GP (1981) Protein from beef heart mitochondria inducing the potassium channel conductivity of bilayer lipid membrane. *Biofizika*. 26:451-7.
- Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-8.
- Miyashita T, Reed JC (1992) bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEHI7.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res*. 52:5407-11.

- Monaghan P, Robertson D, Amos TA, Dyer MJ, Mason DY, Greaves MF (1992) Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem.* 40:1819-25.
- Murphy MP, Echtay KS, Blaikie FH, Asin-Cayuela J, Cocheme HM, Green K, Buckingham JA, Taylor ER, Hurrell F, Hughes G, Miwa S, Cooper CE, Svistunenko DA, Smith RA, Brand MD (2003) Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *J Biol Chem.* 278:48534-45.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 74:1124-36.
- Nakai M, Takeda A, Cleary ML, Endo T (1993) The bcl-2 protein is inserted into the outer membrane but not into the inner membrane of rat liver mitochondria in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 196:233-9.
- Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ, Wilcox JN, Thourani V, Guyton RA, Vinten-Johansen J (2000) Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovasc Res.* 45:661-70.
- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14681-6.
- Nayler WG (1981) The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am J Pathol.* 102:262-70.
- Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Pénicaud L, Casteilla L (1997) A role for the uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 11:809-15.
- Nicholls DG, Ferguson SJ (2002) *Bioenergetics 3*, Academic Press, San Diego, CA, USA,.
- Nicholls DG, Rial E (1999) A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J Bioenerg Biomembr.* 31:399-406.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 276:38388-93.
- Oldenburg O, Cohen MV, Downey JM (2003) Mitochondrial K_{ATP} channels in preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 35:569-75.
- O'Rourke B (2000) Myocardial K_{ATP} channels in preconditioning. *Circ Res.* 87:845-55.
- Orrenius S (2004) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett.* 149:19-23.
- Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL (1998) The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 273:7770-5.
- Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem.* 267:26062-9.
- Pereverzev MO, Vygodina TV, Konstantinov AA, Skulachev VP (2003) Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans.* 31:1312-5.
- Polster BM, Kinnally KW, Fiskum G (2001) BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J Biol Chem.* 276:37887-94.
- Pryor WA, Squadrito GL (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 268:699-722.
- Reed JC (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene.* 17:3225-36.
- Reis DJ, Golanov EV, Galea E, Feinstein DL (1997) Central neurogenic neuroprotection: central neural systems that protect the brain from hypoxia and ischemia. *Ann N Y Acad Sci.* 835:168-86.
- Rouslin W, Broge CW, Guerrieri F, Capozza G (1995) ATPase activity, IF1 content, and proton conductivity of ESMP from control and ischemic slow and fast heart-rate hearts. *Bioenerg Biomembr.* 27:459-66.
- Rouslin W, Broge CW (1996) IF1 function in situ in uncoupler-challenged ischemic rabbit, rat, and pigeon hearts. *J Biol Chem.* 271:23638-41.
- Sarafian TA, Bredesen DE (1994) Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? *Free Radic Res.* 21:1-8.
- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM (1997) Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation.* 95:320-3.

- Schon E, Bonilla E, DiMauro S (1997) Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr.* 29:131-49.
- Schultz JE, Qian YZ, Gross GJ, Kukreja RC (1997) The ischemia-selective K_{ATP} channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 29:1055-60.
- Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, Korsmeyer SJ (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell.* 2:55-67.
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H, Tsujimoto Y (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1455-9.
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 399:483-7.
- Singer TP, Ramsay RR (1990) Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update. *FEBS Lett.* 274:1-8.
- Skulachev VP (1997) Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Biosci Rep.* 17:47-366.
- Skulachev VP (1998) Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 423:275-80.
- Sluse FE, Jarmuszkiewicz W (2002) Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. *FEBS Lett.* 510:117-20.
- Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 273:59-63.
- Sousa SC, Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF (2003) Ca²⁺-induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. *FEBS Lett.* 543:179-83.
- Starkov AA, Fiskum G (2001) Myxothiazol induces H₂O₂ production from mitochondrial respiratory chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 281:645-50.
- Starkov AA, Fiskum G (2002) H₂O₂ production by brain mitochondria is regulated by the membrane potential and depends on the nature of the oxidizable substrate. *Free Radical Bio Med* 33:49.
- Starkov AA, Fiskum G (2003) Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem.* 86:1101-7.
- Starkov AA, Polster BM, Fiskum G (2002) Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem.* 83:220-8.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 277:44784-90.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC (2001) A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem.* 276:38084-9.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M, Kroemer G (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med.* 184:1331-41.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 397:441-6.
- Sutton HC, Winterbourn CC. (1989) On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic Biol Med.* 6:53-60.
- Talbot DA, Lambert AJ, Brand MD (2004) Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett.* 556:111-5.
- Tatoyan A, Giulivi C (1998) Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 273:11044-8.
- Tomei LD, Umansky SR (2001) Apoptosis and the heart: a brief review. *Ann N Y Acad Sci.* 946:160-8

- Tsujimoto Y, Shimizu S (2000) Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 466:6-10.
- Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep.* 17:3-8.
- Turrens JF, Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 191:421-427.
- Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD (1982) The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys.* 217:401-10.
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 237:408-14.
- Valdez LB, Zdobynj T, Alvarez S, Bustamante J, Costa LE, Boveris A (2004) Heart mitochondrial nitric oxide synthase. Effects of hypoxia and aging. *Mol Aspects Med.* 25:49-59.
- Vanden Hoek TL, Shao Z, Li C, Zak R, Schumacker PT, Becker LB (1996) Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia. *Am J Physiol.* 270:H1334-41.
- Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT (1998) Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 273:18092-8.
- Vanden Hoek T, Becker LB, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT (2000) Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ Res.* 86:541-8.
- Vercesi AE (2001) The discovery of an uncoupling mitochondrial protein in plants. *Biosci Rep.* 21:195-200.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102:43-53.
- Voehringer DW (1999) BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic Biol Med.* 27:945-50.
- Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 283:1482-8.
- Waypa GB, Schumacker PT (2002) O₂ sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: the mitochondrial door re-opens. *Respir Physiol Neurobiol.* 132:81-91.
- Wohlrab H (1980) Purification and reconstitution of the mitochondrial phosphate transporter. *Ann N Y Acad Sci.* 358:364-7.
- Yang W, Block ER (1995) Effect of hypoxia and reoxygenation on the formation and release of reactive oxygen species by porcine pulmonary artery endothelial cells. *J Cell Physiol.* 164:414-23.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 275:1129-32.
- Yao Z, Gross GJ (1993) Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. *Am J Physiol.* 264:H2221-5.
- Ytrehus K, Liu Y, Downey JM (1994) Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol.* 266:H1145-52.
- Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL (2001) Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res.* 89:1177-83.
- Zhao Y, Xu JX (2004) The operation of the alternative electron-leak pathways mediated by cytochrome c in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 317:980-7.
- Zoratti M, Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 1241:139-76.
- Zorov DB, Krasnikov BF, Kuzminova AE, Vysokikh MYu, Zorova LD (1997) Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. *Biosci Rep.* 17:507-20.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 274:11549-56.