Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

RUDÁ PRESTES E ALBUQUERQUE

Desenvolvimento de novas estratégias para a minimização do dano de isquemia-reperfusão.

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira

Versão original

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Albuquerque, Rudá P.
Desenvolvimento de novas estratégias para a minimização do dano de isquemia-reperfusão. / Rudá P. Albuquerque; orientador Julio C. B. Ferreira. -- São Paulo, 2018.
77 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. isquemia-reperfusão. 2. UPRam. 3. Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP). 4. Clivagem de OPA. 5. OMA-1. I. Ferreira, Julio C. B., orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rudá Prestes e Albuquerque

Titulo da Dissertação/Tese: **Desenvolvimento de novas estratégias para a minimização do dano de isquemia-reperfusão.**

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **799/2016** referente ao projeto intitulado: "***Caracterização da interação mitocondria-citosol na manutenção da proteostase celular***" sob a responsabilidade de ***Rudá Prestes e Albuquerque*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Júlio César Batista Ferreira,*** do Departamento de Anatomia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 08 de março de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus amigos, parentes, e especialmente à minha mãe pelo apoio incondicional em todos os momentos desta jornada.

Agradeço também as agências de fomento FAPESP e CAPES pelo financiamento do projeto.

Resumo

Albuquerque RP. Desenvolvimento de novas estratégias para a minimização do dano de isquemia-reperfusão. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais). São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2018.

O processo de isquemia-reperfusão é responsável pela geração de um dano agudo em uma série de órgãos do corpo humano, e, no coração, é o principal causador da doença crônica conhecida por insuficiências cardíaca. Atualmente não existe nenhuma opção terapêutica disponível na prática clínica contra esta injúria. Com o objetivo de desenvolver uma nova estratégia de combate a este dano, no presente trabalho investigamos a promessa da aplicação da recém-descoberta via UPRam num modelo de hipóxia reoxigenação *in-vitro*, sem obter sucesso. Contudo, os resultados gerados nestes experimentos forneceram pistas de que o uso do desacoplador CCCP é capaz de reduzir o dano deste insulto, porém o mecanismo celular responsável por esta proteção permanece desconhecido. Tentativas de desvendar este mecanismo utilizando a via lisossomal-autofágica ou a clivagem de OPA-1 falharam, mas produziram importantes insights a respeito do papel da protease mitocondrial OMA-1 no processo de hipóxia-reoxigenação, abrindo caminho para novos estudos subsequentes.

Palavras-chave: Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP). Isquemia-reperfusão. Cardioproteção. H9c2. UPRam. Autofagia. Clivagem de OPA-1.

Abstract

Albuquerque RP. Development of novel strategies for mitigating ischemia-reperfusion damage. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2018.

Ischemia-reperfusion injury is a process that occurs in many human organs including the heart, where it is the main trigger to heart failure, a chronic disease that kills over 40% patients only five years following the first diagnosis. Despite the bulky research on the subject, there is no available therapy on clinical practice against this insult. Attempting to develop a novel strategy to mitigate this damage, we investigated if the pro-survival effect of the recently discovered UPRam pathway could be protective in an *in-vitro* model of ischemia reperfusion. Despite the negative results regarding its conservation on mammalian cells, treatment with the mitochondrial uncoupler CCCP was proven to reduce cell death under this process, but the cellular mechanism responsible for this protection remained elusive. Aspiring to unravel this cellular response, we tested whether autophagy or OPA-1 cleavage was capable of abrogating the verified protection, but the results came back negative. Regardless of that, the behavior of $OMA^{-/-}$ cells over H/R stress has given new insights on novel strategies comprising I/R injury abrogation.

Key words: Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP). Ischemia-reperfusion. Cardioprotection. H9c2. UPRam. Autophagy. Opa-1 cleavage.

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....15
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....31
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....34
4 CONCLUSÃO.....73
5 REFERÊNCIAS.....75

1 INTRODUÇÃO

A isquemia é uma condição patológica caracterizada pela obstrução do fluxo sanguíneo em determinado tecido. De acordo com a organização mundial da saúde, apenas no ano de 2015, uma em cada quatro mortes no mundo foi atribuída ao acidente vascular cerebral ou ao infarto do miocárdio (IM), sendo esta ultima responsável pelo óbito de 8,8 milhões, segundo dados da OMS (http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GHE2015_Deaths_Global_2000_2015.xls?ua=1). Além das mortes diretamente atribuídas, o infarto do miocárdio ainda é a principal causa da insuficiência cardíaca (1), doença crônica que mata 40% dos pacientes em até 5 anos após o diagnóstico (2). O Brasil ocupa a quinta colocação no ranking de óbitos causados por IM, contabilizando 100 mil mortes no ano de 2010 (ultimo ano em que este dado foi divulgado) (3).

Apesar dos números alarmantes, o infarto do miocárdio já fora mais mortal. O avanço nas intervenções contra IM chegou ao seu procedimento mais eficaz em 1983, quando, associada à terapia trombolítica se obteve sucesso ao implementar a intervenção de angioplastia (4), um importante marco na luta contra o infarto do miocárdio. Apenas nos Estados Unidos da América, meio milhão de procedimentos são realizados anualmente (2). Neste novo paradigma, os trombos responsáveis pela obstrução da vasculatura coronariana são fisicamente desfeitos, culminando com o reestabelecimento da circulação no local, fato que diminuiu significativamente a mortalidade histórica do IM (5). Contudo, apesar de indiscutivelmente benéfica, a recuperação da circulação é responsável pela geração de um novo tipo de dano, chamado de dano por isquemia-reperfusão (I/R).

A isquemia-reperfusão é uma condição patológica em que uma interrupção do fluxo sanguíneo (isquemia) é subsequentemente revertida (reperfusão), imprimindo assim uma interrupção momentânea no aporte de oxigênio e nutrientes para as áreas acometidas. Este processo não ocorre exclusivamente no momento da angioplastia cardíaca, mas também nos rins, cérebro, fígado ou até no corpo inteiro quando há uma parada cardíaca

seguida de reanimação (6). Para entender como este processo é capaz de gerar um dano ao organismo é importante compreender os eventos celulares envolvidos em cada uma das etapas separadamente. Desta forma, uma breve revisão da literatura acerca dos principais fenômenos conhecidos na lesão de Isquemia/Reperfusão será relatada a seguir.

Alterações celulares durante a isquemia

As constantes contrações cardíacas fazem com que o coração seja um dos órgãos de maior consumo energético de todo o corpo. De fato, o consumo de ATP nos cardiomiócitos é dividido, quase que meio a meio, entre recaptação de cálcio e deslizamento de miofilamentos contráteis (Fig. 1A), e para manter esta alta taxa metabólica, os cardiomiócitos utilizam a fosforilação oxidativa para produzir 95% de seu ATP, utilizando como combustível preferencial os ácidos graxos (7) (Fig. 1A).

No quadro do infarto agudo do miocárdio, em que observa-se a oclusão de uma artéria coronária, o tecido irrigado por este vaso sofre de uma diminuição no aporte de nutrientes e oxigênio, e estas células agora imersas num ambiente isquêmico passam por uma mudança metabólica, favorecendo o metabolismo anaeróbico em detrimento do oxidativo. Desta forma o destino do piruvato gerado na via glicolítica não mais será a conversão em acetyl coA (e subsequente incorporação ao ciclo de Krebs), mas sim a transformação em lactato, o que acaba provocando a acidificação do pH citoplasmático e extracelular (que chega a valores menores que 7,0) (7, 8). O aumento na concentração de íons H^+ característico do metabolismo anaeróbico provoca um desequilíbrio na homeostase iônica entre o meio extracelular e o citosol, que, após uma sequencia de eventos compreendendo mudanças nos sentidos da atividade de diversos canais iônicos presentes na membrana plasmática, culmina no alto influxo de Ca^{2+} para o citoplasma (9, 10).

A alta concentração citosólica de Ca^{2+} durante a isquemia traz importantes alterações homeostáticas para o funcionamento da célula. Primeiramente, o cálcio é responsável por ativar calpaínas (proteases

citosólicas cuja atividade é dependente de cálcio), que clivam componentes contrateis e estruturais, gerando déficits funcionais e alterações morfológicas nas células imersas no ambiente isquêmico. A contribuição de calpaínas para a morte celular necrótica já é um fator amplamente reconhecido durante o processo de I/R do miocárdio (11). Além disso, a associação da falta de ATP com a sobrecarga de cálcio ainda impede que a interação entre actina e miosina seja revertida, criando-se portanto uma série de pontes entre estas proteínas contráteis. Isso provoca uma severa contratura no coração, quadro chamado por cirurgiões de *stone heart* (coração de pedra) (12) (Fig.1B).

Além disso, com a menor eficiência energética característica da via glicolítica, associada à mobilização celular das reservas energéticas, estabelece-se um cenário em que a oferta energética celular é incompatível com a demanda, o que provoca a diminuição na concentração citoplasmática de ATP, caracterizando o fenômeno da hibernação metabólica (10).

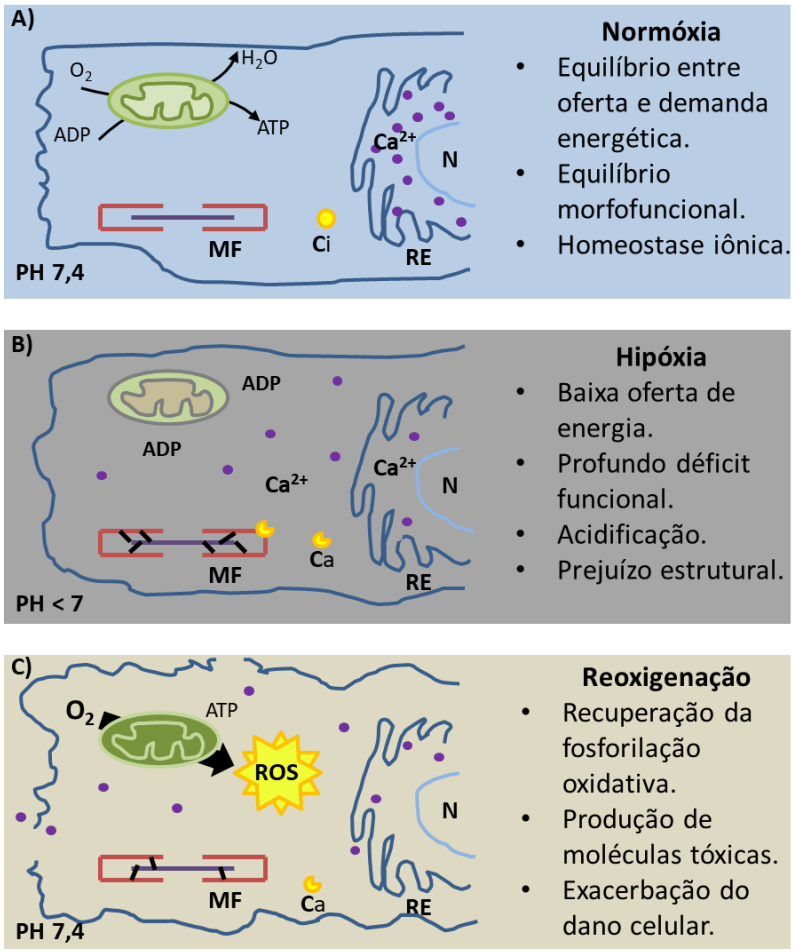

Figura 1: esquema ilustrativo da fisiologia celular do cardio miócito em condições normais (A), sob condições hipóxicas (B) ou no momento agudo da reperfusão (C). MF miofibrilas, N núcleo, Ci Calpaína inativa, Ca calpaina ativa, RE retículo endoplasmático, círculos roxos simbolizam íons Ca^{2+}.

A diminuição dos níveis de ATP compromete o funcionamento global de proteínas ATPases, tendo consequências determinantes em todos os processos celulares, como a manutenção dos gradientes iônicos celulares, ou a contração das

miofibrilas (7). O déficit energético compromete o funcionamento da proteína SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca*$^{2+}$ *ATPase*), que realiza a recaptação dos íons Ca^{2+} do citosol para o interior do retículo sarcoplasmático. Desta forma, o cálcio extra que invadiu o citoplasma não é realocado no compartimento celular adequado, gerando o quadro de sobrecarga de cálcio (do inglês *calcium overload*) (9, 10).

Para resolver este desbalanço energético, a primeira resposta celular se dá no sentido de mobilizar as reservas metabólicas da célula, que, no caso dos cardiomiócitos, são compostas por uma quantia limitada de glicogênio (13). Na medida em que estes estoques passam a se esgotar, os cardiomiócitos lançam mão de uma segunda linha de defesa contra o déficit metabólico, a ativação da via autofágica (Alimentar-se de si mesmo –tradução livre). Esta via é responsável por reciclar componentes celulares que, ou estão danificados, ou passam a ser desnecessários neste cenário de depressão metabólica, atingindo uma diminuição no consumo de energia, bem como o fornecimento de novos substratos energéticos a serem usados pela célula.

A autofagia é crucial para a sobrevivência dos cardiomiócitos durante a isquemia (14), porem, ao passo que os componentes recicláveis vão se esgotando, a via passa a se tornar deletéria, levando a um tipo de morte celular programada chamado *Autophagy-related cell death* (ARCD) (15). Desta forma, é amplamente aceito que a isquemia do miocárdio é apenas temporariamente tolerável, dadas as limitações das defesas celulares contra estas injúrias listadas acima, e por este motivo a reperfusão do tecido é o primeiro ato terapêutico na tentativa de salvar o paciente do óbito (8). Contudo, o reestabelecimento da circulação no tecido isquêmico não é capaz de remediar contra todas as alterações celulares ocorridas, e paradoxalmente, é responsável pela geração de novos eventos deletérios às células, que serão discutidos a seguir.

Alterações celulares durante a reperfusão

A reperfusão do tecido é vista como um mal necessário. O reestabelecimento da circulação no tecido cardíaco isquêmico tem de ser realizado o mais rápido possível, com o objetivo de garantir a limitação da área infartada, preservar a função ventricular e prevenir o desenvolvimento do quadro de insuficiência cardíaca (8). O fluxo sanguíneo é capaz de remover o excesso de H^+ e os intermediários metabólicos produzidos durante a isquemia, permitindo a rápida recuperação do pH de 7,4. Apesar destes benefícios, alterações fisiológicas celulares ocorridas em resposta às novas condições ambientais provocadas pela reperfusão, são responsáveis pela geração e propagação de um novo tipo de dano celular. A sequência temporal de eventos desencadeados por esta intervenção é o que caracteriza a lesão de isquemia-reperfusão, e suas implicações são manifestadas desde segundos após a cirurgia (com a geração de moléculas toxicas), até dias (com a contribuição da resposta imune), ou anos (caso o quadro se desenvolva para a insuficiência cardíaca).

A mais amplamente estudada das causas do dano da I/R talvez seja o estresse oxidativo. A variação na tensão de oxigênio observada durante a reperfusão é responsável pela exacerbada produção de espécies reativas de oxigênio, que acabam por vencer a defesa redox celular, gerando o quadro conhecido por *burst* oxidativo. Estas moléculas (que neste trabalho serão chamadas em conjunto de ROS –*reactive oxygen species*) são geradas em diversos compartimentos celulares, como peroxissomos, citosol e principalmente na mitocôndria, e contribuem veementemente para a propagação do dano da reperfusão (13).

Dada a elevada reatividade, estas moléculas são capazes de reagir com qualquer componente celular, gerando prejuízos estruturais, funcionais e bioquímicos, através da produção de outras classes de moléculas reativas (10). Desta forma, as ROS causam um dano celular generalizado, podendo finalmente levar à morte celular via necrose ou apoptose, pela abertura do poro de transição mitocondrial (mPTP) (8, 10, 15).

Apesar da exacerbada produção de ROS, o reestabelecimento da tensão de oxigênio é capaz de reativar a fosforilação oxidativa (mesmo que com a redução da atividade dos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons) (16), e a produção de ATP é retomada às custas da oxidação de ácidos graxos. Neste novo cenário de oferta de ATP associada à alta concentração de Ca^{2+}, o musculo recém reperfundido se contrai de maneira desordenada, causando o quadro de arritmia (9). Esta contração desordenada ocorrendo próxima a células com contraturas severas impulsiona a ruptura das membranas, provocando a morte celular necrótica (*contraction band necrosis*). (12). A recuperação do pH fisiológico também tem o efeito de permitir a plena ativação das proteases calpaínas, que estavam parcialmente inativas devida a condição acídica, e portanto, agora contribuem ainda mais para a morte celular (17).

A morte celular necrótica é responsável pelo envolvimento de um componente extra tecidual durante a lesão de I/R do miocárdio. Com o rompimento da membrana citoplasmática, e subsequente extravasamento do citoplasma no meio extracelular, moléculas imunorreativas chamadas DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), como ATP e a proteína HMGB1, sinalizam o dano tecidual para o sistema imune (15). Uma vez sensibilizadas, células do sistema imune migram da corrente sanguínea para o interstício, caracterizando o processo de inflamação estéril (6), responsável por exacerbar ainda mais o dano tecidual.

O vasto investimento financeiro e intelectual empregado no estudo dos eventos celulares e moleculares envolvidos durante a reperfusão do miocárdio foi justificado, na imensa maioria das vezes, pela demanda social de novas terapias que mitigassem a morbidade e a mortalidade decorrente desse insulto. De fato, muitos avanços foram alcançados nesta luta, e alguns exemplos destes serão discutidos a seguir.

Opções terapêuticas contra o dano de I/R

Como mencionado acima, a magnitude do dano decorrente da reperfusão do tecido isquêmico é diretamente proporcional ao tempo e a área da isquemia apresentada no episódio. Desta forma, a prontidão do diagnóstico, e a minimização do tempo transcorrido entre a aparição dos primeiros sintomas da isquemia e a intervenção cirúrgica ainda são os fatores mais críticos no sentido de limitar a área de infarto e o desenvolvimento dos efeitos deletérios decorrentes da I/R. O vasto e crescente conhecimento acerca dos eventos contribuintes para o estabelecimento desta lesão permitiu o desenvolvimento de uma série de estratégias experimentais farmacológicas com o objetivo de mitigar seu dano, e algumas delas serão discutidas a seguir.

Talvez a mais ilustrativa das estratégias em descompasso entre aplicação e ciência de base seja o pré-condicionamento isquêmico. Um estudo seminal datado de 1986 de *Murry et al.* (18) foi responsável pela descoberta de que curtos eventos de isquemia/reperfusão, quando realizados antes de uma isquemia sustentada, tem o efeito de reduzir drasticamente a área de infarto num modelo canino. Desde então, uma série de estudos tentando desvendar os mecanismos celulares e moleculares desta proteção foram realizados, tendo validado estes achados em diversos outros modelos experimentais, e até a data de hoje este estudo conta com 9656 citações. Embora seus mecanismos ainda não estejam completamente elucidados (13), o pré-condicionamento isquêmico abriu campo para o desenvolvimento de novas estratégias, como o pós condicionamento isquêmico (em que a reperfusão é realizada de maneira intermitente, com curtos eventos de isquemia/reperfusão após a isquemia sustentada) ou o condicionamento isquêmico remoto (em que curtos episódios de I/R realizados no braço do paciente demonstraram efeito protetor contra a reperfusão em outros órgãos, incluindo o coração). Contudo, estas estratégias ainda não se demonstraram robustas o suficiente para transpor a barreira dos ensaios clínicos para a aplicação (13, 19).

As estratégias de utilização do burst oxidativo como alvo de desenvolvimento de terapias contra o dano de I/R não obtiveram maiores sucessos. O emprego de antioxidantes como N-acetilcisteína, α-tocopherol

(vitamina E) ou propofol na reperfusão também foi capaz de apresentar resultados promissores em estudos pré-clínicos, embora quando desafiados em ensaios clínicos, seus efeitos sobre a mortalidade e morbidade dos pacientes tratados foram, sendo otimista, limitados (13). Estas moléculas demonstram capacidades diferentes de reação com as diferentes moléculas que compõe o estresse oxidativo, assim, o uso de um único antioxidante não é capaz de prevenir o dano referente ao burst oxidativo como um todo. Além disso, a efetividade de um antioxidante é uma função de sua concentração (disponibilidade), e talvez a demanda biológica para que estas moléculas surtam algum efeito protetor exceda a capacidade de entrega durante a reperfusão.

Outra abordagem para a questão no âmbito da geração de moléculas toxicas durante o processo de I/R, é a de ativação das defesas endógenas da célula, como por exemplo a enzima aldeído desidrogenase-2 (ALDH2). Esta enzima localizada na matriz mitocondrial é responsável por metabolizar aldeídos de cadeia curta produzidos no quadro da reperfusão, como o 4-hidróxido-2-nonenal (4HNE) ou malonaldeído, e o aumento da sua atividade mediado pela molécula ativadora Alda-1 é capaz de provocar diminuições na área de infarto em modelos animais *ex-vivo* e *in-vivo* de I/R (20). Devido a sua alta aplicabilidade em diversas etiologias, ensaios clínicos estão sendo realizados em diferentes doenças, mas os nenhum resultado de nenhum destes testes ainda fora publicado.

O combate à inflamação estéril decorrente da I/R também se tem obtido sucesso em testes pré-clínicos. A molécula TAK-242 (antagonista do receptor TLR4 de células do sistema imune) e anticorpos contra a proteína do sistema complemento C5 também se demonstraram capazes de mitigar a agressividade da reperfusão em modelos experimentais de isquemia/reperfusão cardíaca, mas, assim como as outras estratégias listadas acima, ainda não estão disponíveis para o tratamento na clínica.

Os efeitos deletérios da sobrecarga de cálcio também foram alvo do desenvolvimento de compostos bioativos. A inibição de calpaínas já fora empregada experimentalmente, e o inibidores CI-1, CI-3 (*calpain inhibitor* 1 e 3

respectivamente) e MDL-28170 também foram capazes de provocar uma diminuição na área de infarto (11, 21). O mesmo efeito foi verificado com o inibidor de contratura 2,3 Butanodione monoxime (22).

Além dos exemplos citados aqui, outras moléculas já foram reportadas como capazes de diminuir a área de infarto nos mais diversos modelos experimentais de I/R, das quais, um número menor já fora testado em ensaios clínicos e o resultado não fora diferente: Até o dia de hoje, não existe nenhuma alternativa disponível na prática clínica para a lesão de reperfusão. Desta forma, fica claro que estamos vivendo em um momento de grande descompasso entre a ciência de base e a aplicação, em que a urgente demanda por novas terapias permanece desguarnecida, fato que justifica os assustadores números epidemiológicos associados a essa injúria.

Uma especulação plausível do porque isso acontece talvez seja a própria natureza multifatorial do dano de isquemia reperfusão. As moléculas até então testadas procuram amenizar especificamente apenas um dos efeitos deletérios da doença, e portanto, apesar de melhorar os marcadores bioquímicos desta resposta alvo, os demais fatores deletérios ainda persistem gerando um dano de grande magnitude, assim limitando a robustez da terapia candidata, fazendo com que ela falhe no teste clínico.

É verdade que, teoricamente, quanto mais *downstream* for o alvo de uma droga, menores serão os riscos de desenvolvimento de efeitos adversos contra uma determinada terapia. Contudo no caso de doenças multifatoriais, os benefícios múltiplos atingidos pelo estímulo em alvos mais *upstream* possam oferecer retornos maiores, já que tem a possibilidade de atuar em mais de um componente deletério de uma só vez.

Desta forma, no presente trabalho estabelecemos como <u>objetivo principal o desenvolvimento de uma nova estratégia para limitar o dano de isquemia/reperfusão</u> no miocárdio, com o diferencial de não focar em um único aspecto da gênese do dano, buscando então maximizar sua robustez frente a esta injuria multifatorial.

Antes de entrar nos méritos da história investigativa propriamente dita deste documento, é importante fazer uma ressalva quanto à disposição das informações contidas no mesmo. Para cumprir com o objetivo acima proposto, diferentes estratégias foram empregadas ao longo destes dois anos e meio de pesquisa, sendo que muitas vezes estas abordagens possuíam pouca relação entre si. A transição entre uma ou outra abordagem foi realizada seguindo as evidências naturais observadas em cada experimento, e não apenas em minhas hipóteses iniciais, o que implicou na imediata tomada de decisão a respeito dos rumos do trabalho após cada nova evidencia encontrada.

Dada a particularidade deste modo de trabalho, a forma tradicional de apresentação da tese não me pareceu adequada. A apresentação de todo suporte teórico dos temas que abordei, em uma única seção anterior aos resultados tornaria este documento confuso, já que a ligação entre uma estratégia e outra se deu por meio dos próprios resultados. Por este motivo aproveitei a liberdade das regras do programa de pós-graduação que me permitem unir resultados e discussão em uma mesma seção. Desta forma encontrei o formato ótimo para transitar entre os diferentes âmbitos do trabalho, fornecendo de forma clara e objetiva as justificativas experimentais para cada transição. Assim, o suporte teórico de cada seção será disposto sob demanda, isto é, aparecerá no texto no momento em que for relevante ao então presente estado da investigação.

Esta disposição incomum foi propositalmente executada com o intuito de aumentar a clareza e objetividade do texto, e espero que ao final da leitura, o leitor possa concordar comigo em que esta decisão foi adequada às particularidades do curso investigativo em questão.

Resultados prévios do laboratório

A história desta investigação teve início em resultados preliminares inesperados envolvendo o papel de uma proteína mitocondrial no insulto de I/R. A proteína em questão, chamada Peptídeo Deformilase (PDF), tem uma função determinante para a correta produção de proteínas mitocondriais. Para melhor

descrever os resultados e hipóteses referentes a este experimento, primeiramente é importante compreender quem é a PDF e como ela vai parar em seu local de atuação.

A mitocôndria, organela atualmente presente na imensa maioria dos Eucariontes, era, num passado remoto, um ancestral bacteriano. Em determinado momento na escala evolutiva este ancestral passou a manter relações estritas com uma célula nucleada, até que em determinado momento passou a viver no interior desta, trocando funções e material genético com a célula hospedeira. Com o passar dos anos, este meta organismo se diversificou, e deu origem ao grupo hoje entendido como Eucarionte. Durante este processo estabeleceu-se uma completa dependência do ex-organismo (atual mitocôndria) e a célula hospedeira, e uma das mais proeminentes evidencias deste fato se insere na composição de seu genoma (23).

A mitocôndria possui um genoma próprio, circular, composto por centenas de cópias numa mesma organela, responsável pela codificação de apenas 13 das mais de 1500 proteínas que a compõe (24). A grande maioria de suas proteínas é, portanto, codificada no genoma nuclear, traduzida no citosol, e então direcionada para a organela, onde poderão ocupar qualquer um dos seus quatro (matriz, membrana interna, espaço inter-membranas ou membrana externa) espaços estruturais (23, 24).

A correta localização de cada proteína mitocondrial (codificada no núcleo) depende, dentre outras coisas, de uma sequência de aminoácidos presente no próprio transcrito, responsável pela interação com a maquinaria de importação adequada condizente com sua localização final. Proteínas residentes da matriz mitocondrial possuem uma sequencia localizada na porção n-terminal do transcrito chamada de MTS (*matrix targeting sequence*), composta por uma alta prevalência de aminoácidos positivos (25) que, após interação com o complexo TOM/TIM de importação (24), é clivada no interior da organela pela protease MPP (*matrix processing peptidase*). Esta sequência é pouco conservada entre as proteínas, mas acredita-se que todas formem uma estrutura de α-hélice anfipática reconhecida pela maquinaria de importação (26). Desta forma, proteínas mitocondriais residentes da matriz

possuem duas massas moleculares distintas, uma quando o transcrito está fora da mitocôndria, e outra menor quando este adentra a organela e tem sua MTS clivada.

Ao contrário das proteínas transcritas do genoma nuclear, as codificadas do genoma mitocondrial não possuem nenhuma sequencia sinal para seu endereçamento, já que são todas traduzidas e residentes da matriz. Contudo, um importante detalhe diferencia sua produção da produção de todas as demais proteínas na célula: a iniciação da tradução com a metionina formilada.

A tradução de transcritos de todos os seres vivos se inicia com o aminoácido metionina, mesmo que na imensa maioria dos casos, este seja removido pela proteína metionina aminopeptidase (27). Contudo, em bactérias e derivados, esta metionina sofre uma modificação (formilação) e sua excisão não pode ser concluída a menos que esta modificação seja revertida. Este é o papel atribuído à proteína PDF (28), proteína então determinante no correto enovelamento e função das 13 proteínas mitocondriais codificadas no próprio genoma. A PDF é uma proteína cujo gene está inserido no genoma nuclear, e que exerce sua função na matriz mitocondrial, portanto seu transcrito “imaturo” possui uma MTS que o direciona para este compartimento da organela.

Por motivos particulares ao projeto anterior, meus colegas estavam preocupados em compreender qual o papel desta proteína na injúria de isquemia-reperfusão em células MEF (*mouse embrionic fibroblasts*). Para isso, realizou-se a transfecção destas células (por 24 horas) com dois plasmídeos distintos: o primeiro codificando a proteína fusão de PDF com Citrine (proteína fluorescente semelhante à GFP) e o segundo com a mesma proteína fusão, porém sem a MTS (PDF truncada, ou trPDF) conforme Fig. 2 A. Desta forma, o produto do primeiro plasmídeo seria endereçado à matriz mitocondrial, ao passo que o do segundo ficaria no citosol, e não apresentaria função alguma, já que os substratos para PDF se encontram na matriz da mitocôndria. Em seguida as células foram submetidas à um protocolo de hipóxia-reoxigenação (H/R -um modelo *in-vitro* que mimetiza o processo de I/R que ocorre *in-vivo*), conforme esquematizado na figura 2B.

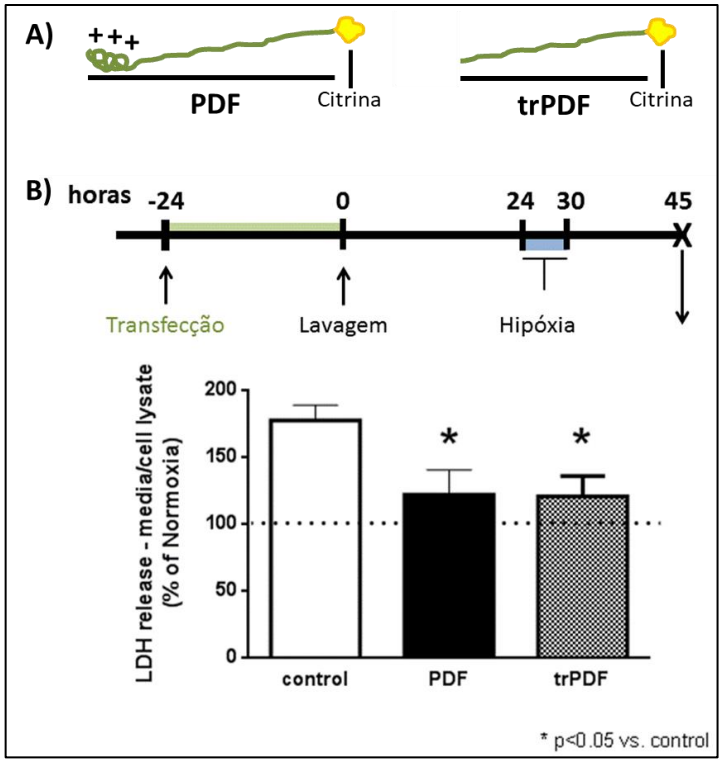

Figura 2. A) Ilustração do produto de cada um dos plasmídeos empregados no estudo. B) cima: linha do tempo do protocolo experimental; baixo: atividade da enzima lactato desidrogenase após protocolo descrito na linha temporal. *p<0,05 em teste t vs control.

Ao final do protocolo a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH- marcador de morte necrótica) foi mensurada e os resultados estão expressos na figura 2B.

Resultados curiosos e até então inexplicáveis foram obtidos deste experimento. Como esperado pela hipótese dos meus colegas, a superexpressão de PDF completa foi capaz de exercer um papel protetor contra o insulto de H/R, porém, o mesmo foi observado com a versão truncada da proteína, que não deveria apresentar efeito nenhum, já que não possui função quando fora da matriz mitocondrial. Este resultado ainda foi reproduzido em outra linhagem celular, demonstrando consistência na resposta.

Coincidentemente, no mesmo ano de 2015, um estudo publicado na revista Nature relatou a descoberta de uma nova resposta celular em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) na qual estes resultados inesperados pareciam se encaixar perfeitamente.

UPRam como alvo promissor

Com o título de “proteínas mitocondriais mal localizadas ativam uma resposta proteostática no citosol” (tradução livre) o trabalho de *Wrobel et al.* (29) descreve uma interessante sequencia de eventos ocorridos no citoplasma em resposta ao acúmulo de proteínas mitocondriais neste compartimento celular. Iniciando sua investigação com um modelo de prejuízo na maquinaria de localização de proteínas residentes do espaço inter-membranas (IMS- *inner*

membrane space), os autores identificaram uma série de elementos que depois foram validados com um inibidor da importação de outras vias.

Proteínas residentes do IMS podem seguir duas vias diferentes para sua importação. Caso estas proteínas possuam MTS, a interação com o transportador da membrana interna tim23 provoca o ancoramento do precursor na membrana, e uma clivagem subsequente faz com que a proteína se disponibilize solúvel no IMS (30). Outras proteínas não possuem a MTS, mas ao invés disso, possuem um motivo sinalizador para locação contido no meio de sua sequencia primária (e não na porção N-terminal, como é a MTS). Este motivo é composto de duas unidades de uma sequencia contendo duas cisteínas separadas por 3 ou 9 resíduos de aminoácidos quaisquer (daí o nome twin $(CX_3C)_2$ e twin $(CX_9C)_2$), e devido a essa riqueza em cisteínas, utilizam uma maquinaria mais especializada, chamada Mia40 (IMS *import and assembly*) (24). Este motivo sinalizador não é clivável como a MTS, e permanece constitutivamente na proteína madura.

Cisteínas são os únicos resíduos de aminoácidos capazes de formar uma forte ligação covalente entre si, chamada ponte dissulfeto. Esse tipo de ligação tem importância fundamental no estabelecimento da conformação ótima de um numero de proteínas, e por esse motivo é indispensável que esta ligação seja formada na hora e lugar correto. Nesta maquinaria de importação, a proteína MIA40 (localizada no espaço inter-membranas) é responsável pela recepção do polipeptídeo a ser importado e pela total oxidação das cisteínas que o compõe (31). O precursor proteico continua associado à MIA40 (em seu sulco hidrofóbico) até que se dobre corretamente e seja dissociado (24).

Essa associação envolvendo a oxidação de cisteínas é um processo redox, e os elétrons captados do precursor precisam ser subtraídos de MIA40 para que esta possa interagir com um próximo polipeptídeo. Este é o trabalho da proteína erv-1, que sequestra esses elétrons e os repassa para a cadeia de transporte de elétrons, fechando assim o ciclo redox (24, 31).

Com um modelo mutante de perda de função da proteína Mia40, os autores do trabalho verificaram que os precursores de proteínas do IMS se localizavam no citoplasma, ao invés do seu espaço residente. Após realizarem

ensaios de proteômica e transcriptomica, identificaram uma série de alterações na abundancia principalmente em vias envolvidas em dois importantes processos celulares: síntese e degradação proteica. Além da diminuição nas proteínas e mRNAs relacionados à componentes ribossômicos, uma diminuição na taxa de síntese proteica fora observada, mensurada pela incorporação de aminoácidos radioativos ao conteúdo proteico.

Por outro lado, proteínas associadas à montagem do complexo multicatalítico do proteassoma mostraram-se elevadas, bem como o estado global de poliubiquitinação e a própria atividade catalítica do mesmo (em resposta ao acúmulo de proteínas mitocondriais no citosol). Resultados semelhantes foram obtidos quando a importação de proteínas mitocondriais com MTS foi inibida, e ainda, ensaios com quatro proteínas individualmente expressas com ou sem o peptídeo sinal demonstraram que o efeito observado não é atribuído ao acúmulo de uma única proteína específica.

Resumidamente, os autores concluem que o acúmulo de proteínas mitocondriais no citosol é combatido de duas maneiras, o aumento da degradação e o bloqueio da síntese proteica global. À esta resposta proteostática ativada pelo acúmulo de proteínas mitocondriais no citosol foi dado o nome de UPRam (*unfolded protein response activated by mistargeted protein*).

Em ultimo, porém não menos importante, os autores mostraram que a UPRam é capaz de conferir resistência às leveduras quando estas eram desafiadas com choque térmico (condição não permissiva à estes organismos), diminuindo a morte celular em até 60% frente à este estresse. Além disso, para que esta resistência fosse adquirida, a ativação do proteassoma demonstrou-se indispensável.

Por outro lado, um segundo estudo publicado no mesmo número desta revista, também em leveduras, encontrou resultados muito semelhantes, mas focando em outra parte do fenômeno. *Wang & Chen* chegaram às mesmas conclusões de Chasinka et al. a respeito da resposta proteostática desencadeada pelo acúmulo de proteínas mitocondriais no citosol, porém investigaram mais a fundo os efeitos que este defeito sustentado é capaz de

produzir. Se a UPRam é capaz de gerar uma resposta protetora contra o choque térmico quando ativada transientemente, o acúmulo sustentado é capaz de provocar uma recém descoberta forma de morte celular, batizada de mPOS (32).

Se não fosse pelo detalhe de ter sido descoberta em *Saccharomyces cerevisiae* e ter protegido essas células ao estresse de choque térmico, a UPRam poderia perfeitamente explicar o porque de nos experimentos preliminares dos meus colegas, a versão truncada da PDF ter sido capaz de conferir proteção às MEF contra o protocolo de hipóxia-reoxigenação. Desta forma, verificar a existência desta via em células de mamíferos pode representar um importante passo para o desenvolvimento de uma nova opção terapêutica contra o dano de isquemia/reperfusão, e por este motivo foi traçado como o primeiro objetivo deste trabalho.

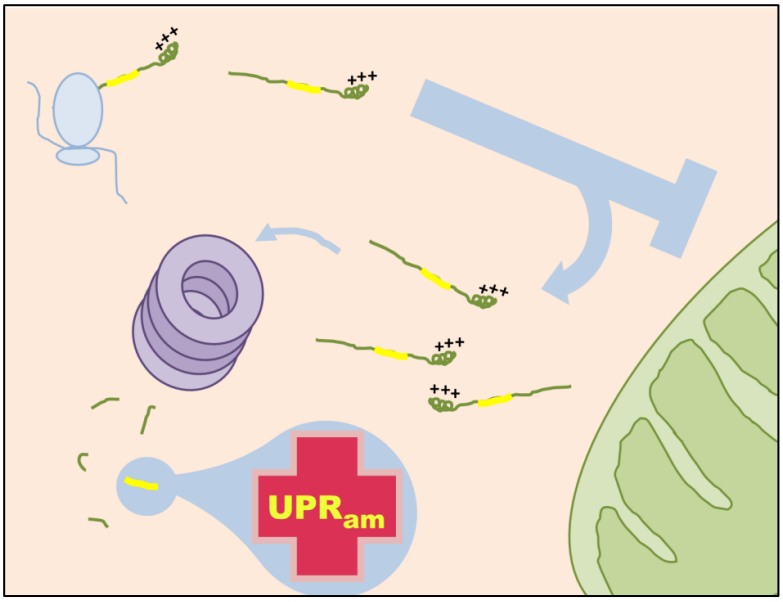

Figura 3: ilustração esquemática da hipótese do estudo. Peptídeos liberados pela degradação proteassomal de proteínas mitocondriais seriam capazes de ativas a UPRam em células de mamíferos.

Além disso, dado o papel indispensável do proteassoma na conferência de tal resistência, hipotetizamos ainda que a molécula natural ativadora da UPRam seria um peptídeo oriundo da degradação de proteínas mitocondriais via proteassoma (conforme esquematizado na Fig.3). Um segundo objetivo, a ser concluído no decorrer ou em trabalhos posteriores seria o de identificar esta molécula e testar sua capacidade de desencadear o efeito citoprotetor da UPRam. O domínio desta molécula seria de grande valor na aplicação desta estratégia na clínica, podendo ser desenvolvida futuramente em uma droga comercial responsável por mitigar os severos danos oriundos da hipóxia-reoxigenação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Cultura de células e extração de proteínas

Células da linhagem H9c2(2-1) foram cultivadas em incubadora CO_2 automática (à 37°C e 5%CO_2) em meio de cultura *Dulbecco's Minimal Eagle's medium* (DMEM) 4,5g/L glicose suplementado com 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS), 100 unidades/ml *penicillin*, 100µg/ml *streptomycin.* Para os experimentos em que as células foram diferenciadas, após plaqueamento na proporção 19,5x10^3 *cels*/cm^2 (o equivalente à 7.500 células por poço de P96*wells*), ao dia seguinte fora substituído o meio de cultura citado à cima por DMEM sem fenol, 4,5g/l glicose, suplementado com 1%FBS e 10ηM *all-trans retinoic acid* (RA- sigma). O cultivo subsequente se deu por sete dias, com a troca periódica do meio de cultura a cada dois dias. Para os experimentos que envolviam análise proteica ou ensaio da enzima lactato desidrogenase, após remoção do meio de cultura, as células aderidas foram lisadas em tampão RIPA (50mM Tris, 150mM NaCl, 0,5% sodium deoxycholate, 1% triton-X).

2.2 Ensaio de atividade catalítica proteassomal in-vitro

A atividade proteassomal do sítio catalítico *chymotrypsin-like* fora avaliada utilizando o substrato fluorescente Suc-LLVY-AMC. Para isso, o lisado celular (40µg de proteína total) foi ensaiado em tampão 25mM Tris-HCl, 5mM $MgCl_2$, pH 7,5. A atividade catalítica fora calculada a partir da taxa de emissão de fluorescência do fluoróforo AMC (λex 380nm, λem 460 nm) ao longo de 60 minutos, adquirida no spectrofluorímetro Biotek.

2.3 Ensaio de síntese proteica

A puromicina é um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces alboniger* e sua estrutura molecular possui grandes similaridades com a molécula de Acyl-tRNA. Por este motivo, a molécula é capaz de se infiltrar no ribossomo e se ligar covalentemente ao polipeptídeo nascente, provocando a interrupção prematura deste. Sob condições controladas, a incorporação de

puromicina às proteínas celulares pode ser usada como indício da velocidade da síntese proteica. Utilizando um anticorpo anti adutos de puromicina (Millipore-MABE343) é possível quantificar as diferenças entre os tratamentos via SDS-PAGE (REF). Desta forma, após os tratamentos indicados, as células foram expostas à um pulse de 10 minutos com puromicina a 5ug/ml, período no qual os adutos foram feitos. Em seguida as células foram lisadas conforme citado acima e os lisados submetidos à imunomarcação conforme descrito abaixo.

2.4 Análise da expressão proteica

Os níveis de expressão das proteínas de interesse foram quantificados por meio da técnica de *Western blot (Wb)*, conforme previamente padronizado no laboratório. Para isso, os lisados em RIPA (conforme descrito acima) foram submetidos à centrifugação (12.000 rcf, por 15 minutos à 4°C), dosados com o reagente de Bradford, e então submetidos à desnaturação (5 minutos de incubação à 95°C) em tampão Laemmli. Um total de 30µg de cada amostra foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sendo as proteínas posteriormente transferidas para uma membrana de PVDF (GE *healthcare*). Na sequencia a membrana foi incubada com solução bloqueadora, anticorpo primário e anticorpo secundário conjugado à peroxidase, sendo a quimiluminescência emitida capturada no fotodocumentador *Uvitec (Cambridge).* Os anticorpos utilizados neste estudo foram os seguintes (**proteína**, empresa- número de catálogo): **HSP60**, Santa Cruz SC-13115; **NDUFa9**, ABCAM AB14713; **PDF**, Sigma SAB1102364; **ALDH2**, Santa Cruz SC-48837; **LETM1**, ABCAM ab96237; **Ubiquitina,** Santa Cruz sc-8017; **α-actina**, Santa Cruz sc-58670; **Puromycin**, Millipore MABE343; **OPA-1**, ABNOVA H00004976; **LC-3**, Cell Signaling 4108-s.

2.5 Protocolo in-vitro de hipóxia-reoxigenação

Após o tratamento com as drogas, durações e doses indicadas em cada experimento, as células foram lavadas uma única vez com *phosphate buffer saline* (PBS), e então separadas em dois grupos, de normóxia (cultivado em

Krebs-Henseleit buffer- *110 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM KH_2PO_4; 1,25 mM $MgSO_4$; 1,2 mM $CaCl_2$; 25 mM $NaHCO_3$; 15 mM glicose; 20 mM HEPES; pH 7,4*) ou hipóxia reoxigenação (submetido à hipóxia em Gaspack [BD] em meio que mimetiza o ambiente isquêmico *-125 mM NaCl; 8 mM KCl; 1,2 mM KH_2PO_4; 1,25 mM $MgSO_4$: 1,2 mM $CaCl_2$; 6,25 mM $NaHCO_3$; 5 mM sodium lactate; 20 mM HEPES; pH 6,6*). Após o tempo indicado de hipóxia, ambos os grupos foram mantidos em *Krebs-Henseleit buffer* em incubadora de CO_2 sob condições normóxicas até a respectiva duração da reoxigenação.

2.6 Ensaio de atividade da lactato Desidrogenase (LDH)

A presença da enzima lactato desidrogenase no meio de cultura de células *in vitro* é um indicador de citotoxicidade, e a quantificação dela é inferida pela sua atividade. O mecanismo em que se baseia o protocolo é dependente da reação catalisada pela enzima: piruvato (0,8mM) + NADH (0,2mM) $\rightarrow$ lactato + NAD^+. A reação é efetuada em tampão Tris-HCl 200mM pH=7,3, com 50µL do meio coletado, ou 10 µL do lisado das células aderidas (que representa 10% do total de 100 µL do lisado) em volume final de 200µL. A taxa de oxidação de NADH foi calculada a partir de medidas periódicas da absorbância à 340nm tomadas ao longo de 60 minutos, comprimento de onda de absorção do NADH. Para cada poço, a morte celular foi calculada como *atividade total no sobrenadante/ atividade total (sobrenadante total+lisado total)*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da UPRam em células de mamíferos

Para verificar a ocorrência da UPRam em mamíferos, selecionamos como modelo de estudo a linhagem imortalizada H9c2(2-1) (que neste trabalho será identificada por apenas H9c2). Trata-se de uma linhagem estabelecida em 1976, através do método de passagem serial seletiva à partir do tecido ventricular cardíaco de embriões de ratos (*Rattus norvergicus*)(33). A linhagem conserva vários aspectos presentes em células musculares tanto cardíacas quanto esqueléticas (devido ao seu subjetivo grau de comprometimento) e possui alta capacidade proliferativa e alto conteúdo mitocondrial (33, 34).

O modelo nos pareceu adequado, visto que conserva uma origem cardíaca e alto número de mitocôndrias, portanto sendo relevante para um estudo inicial da sinalização mitocondrial no coração. Optamos pelo uso destas células imortalizadas (que já são usadas há mais de 40 anos) em detrimento da cultura primária, motivados não apenas pela conveniência de se trabalhar com este tipo celular, mas também pela redução do uso de animais para experimentação.

Desta forma, para cumprir o objetivo proposto, além de promover a superexpressão das proteínas PDF (truncada ou não) no meu modelo *in-vitro*, contei com duas alternativas farmacológicas para realizar a inibição transiente da importação de proteínas mitocondriais. Assim como no trabalho original com leveduras, promovi tanto a inibição da importação via MIA40/erv-1 (com o uso da *small molecule* MitoBloCK-6 –*Mitochondrial protein import blockers from the Carla Koehler laboratory-6*) quanto das proteínas detentoras de MTS (com o uso do desacoplador CCCP -Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona).

Nesta fase do projeto, o trabalho resumiu-se a mimetizar as intervenções executadas em leveduras no trabalho de *Wrobel et al.* e verificar se as respostas observadas em H9c2 se assemelhavam àquelas reportadas no trabalho original. Para tanto, me ative aos seguintes fenótipos: 1. Acúmulo de proteínas mitocondriais no citosol. 2. Ativação do sistema ubiquitina-proteassoma 3. Bloqueio da síntese proteica.

Contudo, antes de entrar nos resultados propriamente ditos, é pertinente um breve detalhamento acerca da estratégia de uso e do mecanismo de ação de cada um dos inibidores utilizados neste trabalho.

Estratégia experimental pulse-chase

Com o objetivo de manter a característica transiente na inibição da importação de proteínas mitocondriais, desenhamos experimentos utilizando o racional baseado na estratégia de *pulse-chase*, a mesma utilizada por *Wrobel et al.* (29). A estratégia compreende expor as células à dois momentos distintos: no primeiro momento oferecemos um estímulo, chamado de *pulse*; no segundo momento chamado *chase* o estímulo é cessado e acompanhamos os ajustes tardios. Para facilitar o entendimento dos leitores deste documento, sempre que um esquema do delineamento experimental compreendendo a estratégia de *pulse-chase* for apresentado, o período de *pulse* estará representado pela cor vermelha, enquanto o *chase* estará em cor preta. A primeira ilustração a respeito da estratégia *pulse-chase* está representada na figura 4.

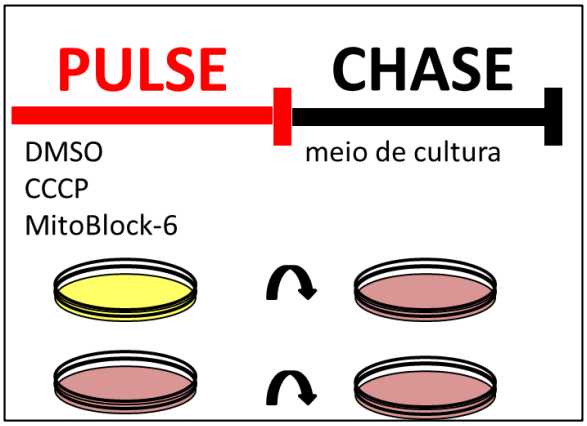

Figura 4: Esquema didático sobre a estratégia de *pulse-chase*. Em cima, representação de linha temporal contendo informações sobre o período do experimento. Em baixo ilustração sobre o que representa fisicamente os períodos *pulse* e *chase* em cada possível grupo.

MitoBloCK-6 e CCCP

A via redox de importação de proteínas mitocondriais residentes do espaço inter-membranas pode ser inibida com o composto MitoBloCK-6. Um *screening* contando com uma livraria de 50.000 compostos foi realizado em um ensaio de atividade com a proteína Erv-1 isolada, e a molécula que atingiu a maior inibição desta atividade foi caracterizada, o MitoBloCK-6. A molécula foi então validada ainda em ensaios com diversos níveis de complexidade, passando por mitocôndria isolada, células em cultura e até em organismos completos (*zebra fish*). Os estudos preliminares demonstraram que após 8 horas de exposição (20μM), células tronco embrionárias humanas (hESCs)

iniciaram o programa apoptótico de morte celular via extravasamento de citocromo C, o que em células HeLa não foi observado nem mediante à 16 horas de exposição (35). Este inibidor, portanto, caracterizou-se por sua eficiência em inibir o funcionamento da maquinaria proposta e por provocar morte celular em determinados tipo celulares.

A importação mitocondrial de proteínas detentoras do peptídeo de transito positivamente carregado em sua porção N-terminal (MTS) é dependente do potencial de membrana mitocondrial, a fim de obter sucesso ao transpor a barreira da membrana interna, sofrendo uma eletroforese natural que culmina com o adentramento do precursor na matriz (24, 29, 30). Desta forma, uma maneira eficiente de impedir que estes precursores sejam corretamente endereçados é a dissipação deste gradiente de prótons, que pode ser alcançada pelo uso de um desacoplador, como o 2,3-dinitrofenol (DNP) ou CCCP (que inclusive foi a molécula escolhida por *Wrobel et al.* no trabalho supracitado).

Contudo, a perda do potencial de membrana mitocondrial acarreta em muito mais efeitos do que meramente a inibição da importação destas proteínas. O próprio nome da categoria destas moléculas (desacopladores) já denota um de seus efeitos fundamentais na homeostase da organela. A diferença de potencial elétrico mantida entre o espaço inter-membranas e a matriz é chamada de força próton-motriz, que é responsável pela transferência de energia da oxidação das coenzimas reduzidas no ciclo de Krebs para a fosforilação do ADP em ATP, processo conhecido por fosforilação oxidativa (oxphos- *oxidative phosphorilation*). Com a perda deste potencial exercida pela atividade destas moléculas, a oxidação de coenzimas é realizada de forma desacoplada à fosforilação de ATP, motivo pelo qual são chamadas de desacopladores. Assim, desacopladores são conhecidos por promover um uso ineficiente dos substratos energéticos celulares.

Além disso, desacopladores já se mostraram capazes de ativar diferentes vias de sinalização celulares, como por exemplo, a via autofágica (36), e diversos efeitos nos mais diferentes modelos já foram relatados na

literatura (uma busca pelo termo “CCCP” sozinho no pubmed retornou 3072 artigos, sendo o mais antigo, de 1962).

Visto que ambas as ferramentas farmacológicas envolvidas neste estudo têm um apelo toxicológico relevante, o início desta investigação foi realizado com a determinação da faixa fisiológica (não tóxica) de concentrações que poderiam ser testadas nos experimentos seguintes. Desta forma, expus as células à 2 horas com diferentes concentrações de CCCP (2h *pulse*) ou 4 horas a diferentes concentrações de MitoBloCK-6 (4h *pulse*), medindo a morte celular depois de cada período, conforme figura 5 A e B respectivamente.

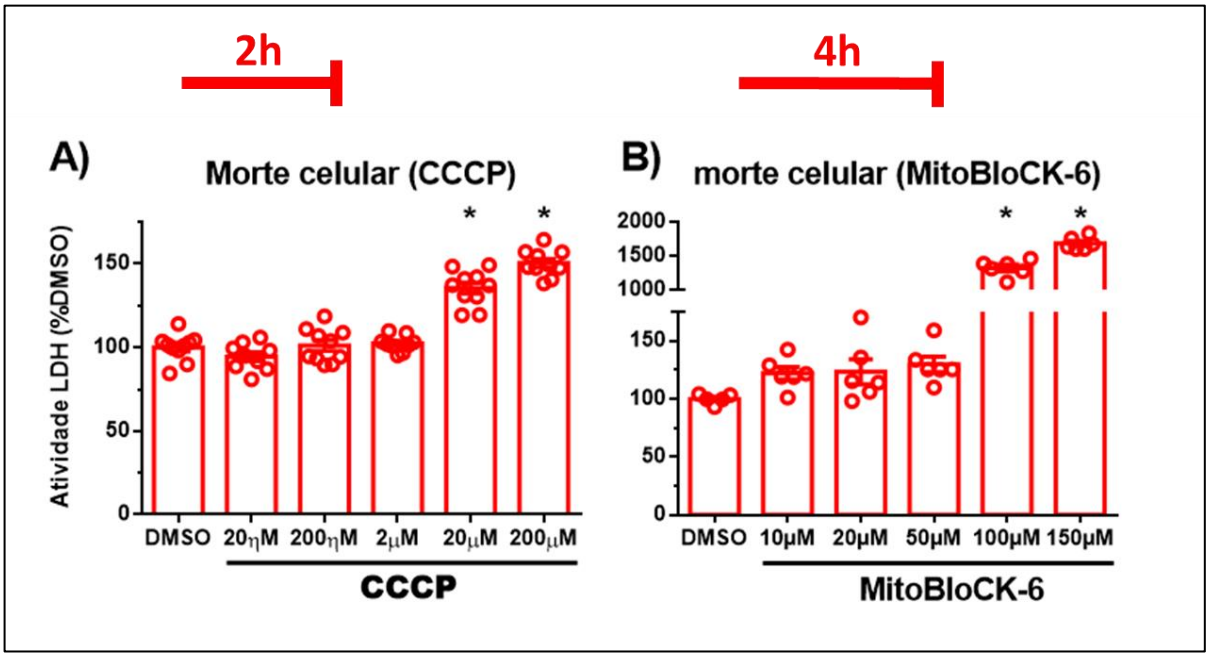

Figura 5: Morte celular provocada pela exposição à duas horas com diferentes doses de CCCP (A- n=10 por condição) ou quatro horas com diferentes doses de MitoBloCK-6 (B- n= 5 por condição).*p<0,05 em teste t vs DMSO.

A exposição ao desacoplador durante duas horas demonstrou-se bem tolerável para este tipo celular, como fica evidente na figura 5A. Apesar de atingirem relevância estatística, as doses de 20 e 200μM não são capazes de aumentar a morte celular neste período nem em 50% em relação à morte basal causada pelo veículo (que é a morte mínima detectável). Assim, estabeleci os limites permissivos para a realização de testes entre 20η e 200μM, embora não necessariamente tenha utilizado todas estas doses nos experimentos subsequentes.

O cenário obtido com a molécula MitoBloCK-6 é um tanto diferente. Apesar de tolerável com doses entre 10 e 50μM, doses maiores se demonstraram altamente tóxicas, provocando dez vezes mais morte do que o veículo sozinho (Fig. 5B). Por este motivo, o limite superior de MitoBloCK-6 foi determinado em 50μM. Vale ressaltar que estes números estão de acordo com os encontrados em outros trabalhos disponíveis na literatura (35).

Estabelecidos os limites da quantidade de cada um dos inibidores selecionados para o estudo, o trabalho pode ser desenvolvido no sentido de verificar a emergência dos fenótipos característicos da UPRam frente aos estímulos de inibição transiente da importação de proteínas mitocondriais. Para facilitar o entendimento deste documento, decidi omitir os diversos passos realizados para a padronização de cada experimento, de maneira que os resultados demonstrados nas seções seguintes serão os obtidos a partir de um experimento representativo daquilo que foi obtido em todos os demais tomados em conjunto. Essa estratégia facilita a fluidez do documento, porém em contrapartida provoca muitas vezes a perda da exatidão dos porquês que justificaram a escolha de cada condição específica. Visto que estes porquês já foram relatados e aprovados no momento de minha qualificação, torna-se conveniente acelerar este trecho do documento.

Os resultados à seguir serão dispostos em tópicos conforme o fenótipo investigado. Dentro de cada tópico haverá uma breve descrição de como este fenótipo se manifestou em leveduras no trabalho de *Wrobel et al*., antes da apresentação do resultado obtido na minha investigação em H9c2. Por ultimo, um breve comentário acerca da adequação ou não entre ambos os estudos fechará o tópico, e uma conclusão com base em todos os tópicos como um todo fechará este capítulo sobre a conservação (ou não) da via UPRam em células de mamíferos.

Provocando o acúmulo de proteínas mitocondriais no citosol

Como mencionado anteriormente, proteínas mitocondriais que utilizam o peptídeo de transito para se localizarem corretamente na mitocôndria dependem do potencial de membrana mitocondrial para seu processo de importação. Além disso, uma vez importadas, estas proteínas perdem a MTS, o

que implica numa diferença de massas entre a cadeia importada e a que permanece no citosol. Portanto, a dissipação do potencial de membrana é capaz de promover o acúmulo de cadeias mitocondriais pesadas, que pode ser verificada em um *Western blot*, assim como fora feito no trabalho de *Wrobel et al*. Contudo, apenas proteínas recém sintetizadas no citoplasma estão sujeitas à este acúmulo, e portanto, a capacidade de detectar este acúmulo vai depender não apenas da capacidade da dose de desacoplador (CCCP) empregada em dissipar o potencial de membrana, mas também da taxa de produção desta proteína (para que cadeias pesadas suficientes para serem detectadas sejam produzidas no tempo de exposição selecionado).

Por outro lado, proteínas que dependem da via Mia40/erv-1 (sensíveis ao MitoBloCK-6) para chegar ao IMS não possuem o peptídeo de transito quando estão fora da mitocôndria, e portanto não apresentam esta diferença de massas entre as cadeias importadas e não importadas. Desta forma a detecção da eficácia do tratamento tomado este fenótipo não pode ser mensurada por um simples Western blot com lisado total. Neste caso seria necessário um fracionamento celular entre as porções mitocondrial e citosólica, procedimento que, apesar de trivial, teve a execução condicionada ao êxito nos demais fenótipos investigados.

Apesar de ser uma implicação já conhecida há muito tempo, não encontrei nenhum trabalho na literatura que tenha estudado a inibição da importação de proteínas em H9c2, logo precisei encontrar as condições ideais para verificar este fenótipo. Para tanto, testei uma série de combinações de tempos, doses e anticorpos diferentes, cada um para uma proteína específica que possui uma MTS de tamanho próprio (como listado na tabela 1).

Proteína	Imatura	Processada	MTS	Refseq
ALDH2	56,5	54,4	2,1	NP_115792.1
HSP60	61,0	58,0	3,0	NP_071565.2
LETM1	83,0	70,7	12,3	NP_001005884.1
NDUFa9	42,6	38,9	3,7	NP_001094222.1
PDF	25,8	23,9	1,9	XP_001073696.3

Tabela 1: Tamanho dos polipeptídeos (em kDa) referentes às cinco proteínas usadas na investigação, e os respectivos códigos de acesso no banco de dados do NIH.

Consegui obter êxito em detectar a presença de uma proteína com a adição da massa prevista para seu peptídeo sinal, conforme demonstrado na figura 6. Além disso, esta adição de massa só é observada no grupo tratado com o CCCP, e não nos demais grupos inseridos como controle, isto é, células sem tratamento (cels), veículo (DMSO) ou MitoBloCK-6.

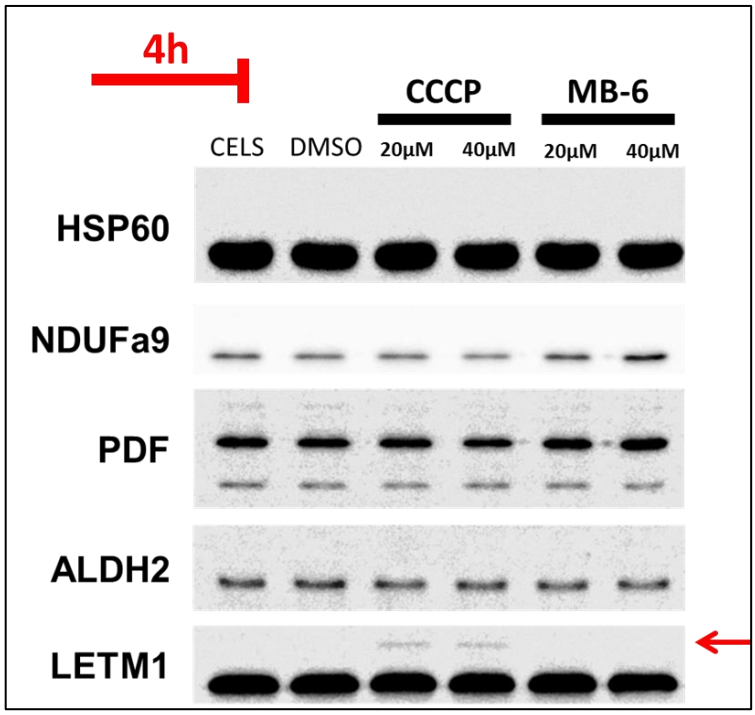

Figura 6: painel de expressão de cinco proteínas mitocondriais após diferentes tratamentos com DMSO, CCCP ou MitoBloCK-6 durante um *pulse* de 4 horas. Em destaque, o peptídeo não processado da proteína LETM1 (adição de 12 kDa na proteína LETM1).

É interessante notar que, apesar de ter tentado com diversas proteínas, das quais para esta figura, trouxe apenas cinco (Figura 6), uma única atingiu níveis suficientes para ser detectada por um *Western blot*. Esta proteína, LETM1 é residente da membrana interna, onde atua formando um canal de cálcio envolvido na captação deste íon para o interior da mitocôndria. É bem verdade que dentre as proteínas expostas na figura, ela é a que apresenta o maior MTS (vide tabela 1), o que sugere que talvez o problema na detecção pudesse ter sido uma pobre separação das bandas.

Contudo, outra proteína que não foi representada nesta figura (embora também tenha sido avaliada nestas condições, e será discutida mais adiante), OPA-1 (*Optic Atrophy-1*), é detentora de uma MTS de tamanho semelhante, com cerca de 10kDa, mas não obtive êxito na detecção de sua banda pesada. Desta forma, acho que neste caso, o fator da taxa de *turnover* fora o preponderante para tanto, visto que os géis foram feitos com a concentração de poliacrilamida adequada para a separação de cada proteína em questão.

Após acumuladas durante o *pulse*, as cadeias pesadas das proteínas mitocondriais não são mais verificadas no *chase*, seja porque foram degradadas pelo proteassoma, seja porque com o reestabelecimento do potencial de membrana, são eficientemente importadas novamente. Para verificar se o mesmo era reproduzido em H9c2, fiz um *Western blot* acompanhando a massa de LETM1 nos momentos de pulse de duas horas (que mostrou-se eficaz em provocar acúmulo em outros experimentos) com 20μM CCCP, e em três durações de chase distintas, de 30 minutos, uma e duas horas, conforme evidenciado na figura 7.

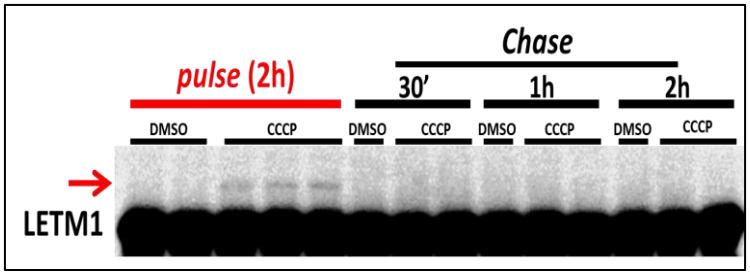

Figura 7:Padrão da proteína LETM1 após *pulse* de 2 horas, *chase* de 30, 60 e 120 minutos com CCCP 20μM ou DMSO.

Assim como publicado com leveduras, o acúmulo de proteínas mitocondriais com o peptídeo sinal detectável no pulse passa a ser indetectável no chase. O tempo necessário para que as bandas pesada sumam foi menor que 30 minutos, o que sugere que, após a lavagem com PBS, as células são capazes de prontamente reestabelecer o potencial de membrana. É verdade que, como mencionado acima, a razão pela qual essas bandas somem pode não ser a importação destes peptídeos, e sim a degradação via proteassoma. Porém, pessoalmente acho mais provável que seja uma mistura de ambos, uma vez que a ativação do proteassoma não é dependente do potencial de membrana mitocondrial, e assim este complexo catalítico pode sim estar ativado ainda enquanto o desacoplador está atuando. Visto que ainda era detectável este acúmulo com quatro horas de pulse, e que passa a ser indetectável quando retiramos a droga após duas horas, a hipótese de que estes polipeptídeos estão adentrando a organela já (pelo menos parcialmente) repolarizada parece fazer mais sentido. Para confirmar esta hipótese seria interessante efetuar a medida do potencial de membrana mitocondrial nas condições supracitadas, porém no atual momento do trabalho este não era um objetivo central.

Desta forma, os resultados obtidos para este fenótipos foram capazes de demonstrar que é de fato possível provocar uma inibição transiente na importação de proteínas mitocondriais possuidoras de MTS com o uso de um desacoplador.

A contribuição do sistema ubiquitina-proteassoma na UPRam

Segundo o trabalho seminal descrevendo a via UPRam, o acumulo de proteínas mitocondriais no citosol provocaria, durante o *pulse* uma maior ubiquitinação de proteínas, e uma atividade proteolítica inalterada. Após cessada a inibição (*chase*) as proteínas poliubiquitinadas seriam digeridas pelo proteassoma, que por sua vez apresentaria uma atividade proteolítica aumentada.

Visando verificar se o mesmo ocorrera em H9c2, realizei experimentos de *pulse* com durações variáveis com CCCP ou DMSO (de 5 minutos à 1 hora), ou então com MitoBloCK-6 (20 ou 50μM) por 30, 60 ou 120 minutos, e ao final realizei um *Western blot* contra proteínas poliubiquitinadas (utilizando o mesmo anticorpo usado pelos autores do paper original). O sinal do anticorpo foi normalizado pela expressão de α-actina, e os valores foram plotados nos gráficos da figura 8.

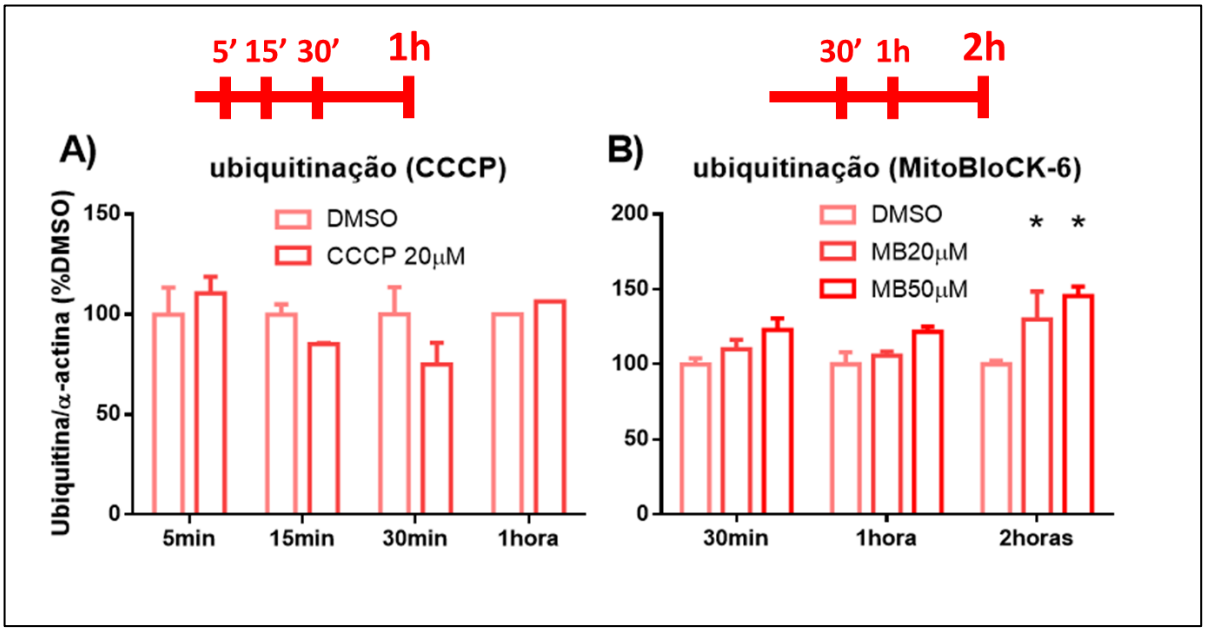

Figura 8: Ubiquitinação total de proteínas após tempos variados com CCCP 20μM (A)) ou da exposição por 30, 60 ou 120 minutos com diferentes doses de MitoBloCK-6.*p<0,05 em teste t vs DMSO.

A atuação de ambos os inibidores foi incapaz de aumentar a quantidade de proteínas poliubiquitinadas durante todos os períodos de pulse investigados, o que contraria os resultados observados em leveduras. A única exceção foi a exposição à duas horas com MitoBloCK-6, com ambas as doses propostas, o que de fato foi de encontro com o preconizado pela literatura.

Mesmo assim, verificamos também se o aumento da atividade proteassomal ocorrera mediante ao bloqueio da importação de proteínas com os mesmos inibidores, e por diversos tempos de *pulse*, conforme exposto na figura 9.

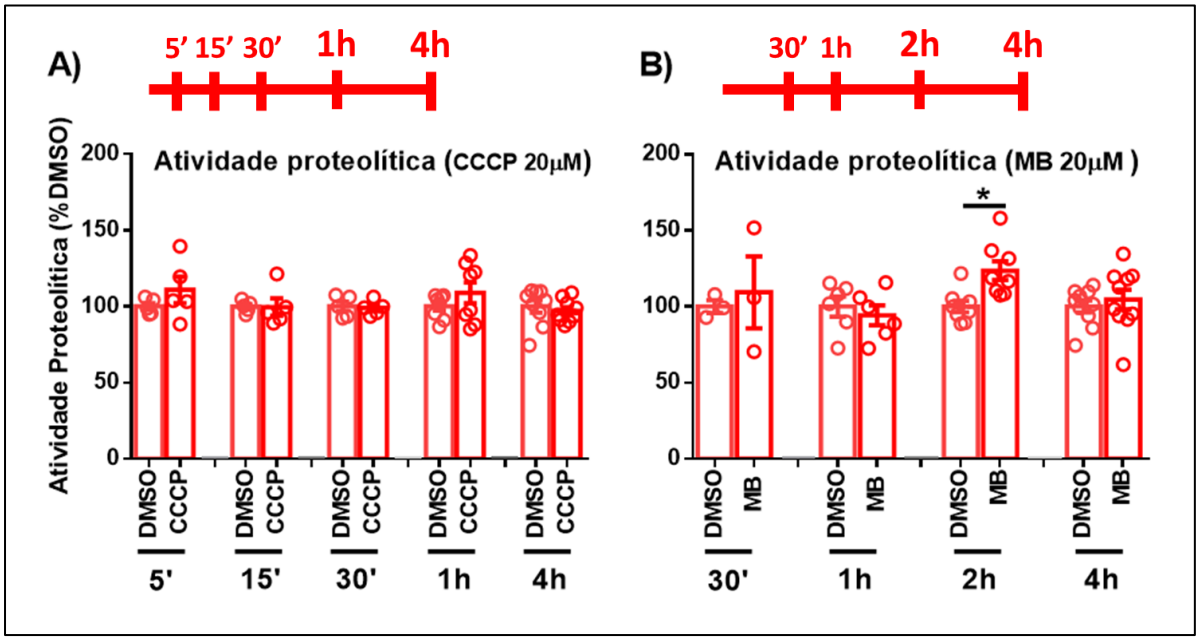

Figura 9: Atividade proteolítica do sítio *Chymotrypsin-like* do proteassoma em diferentes tempos de pulse com A) CCCP ou B) MitoBloCK-6 ambos a 20µM. *p<0,05 em teste t vs DMSO.

Tomados em conjunto todos os cinco experimentos realizados para este fim com CCCP 20µM (embora o mesmo tenha sido verificado com as doses de 10 e 40µM), em nenhum dos momentos investigados observou-se alteração da atividade proteolítica do proteassoma (Fig. 9A), embora um aumento houvesse sido verificado em dois experimentos compreendendo uma hora de exposição (o que justifica a distribuição bimodal observada na barra de 1h na Fig. 9A. Quando a atividade proteassomal fora avaliada durante o chase (resultados omitidos), nenhuma alteração fora verificada, independentemente da dose, tempo de *pulse* ou tempo de *chase* com o uso do desacoplador.

A compilação dos cinco experimentos independentes compreendendo o uso de MitoBloCK-6 indica um aumento sim, com duas horas de exposição à droga conforme Fig. 9B. Apesar de aparentar consistente e significativo, quando vistos individualmente, os experimentos falharam em indicar este aumento em 3 das cinco vezes que foram repetidos. Desta forma, a combinação que se mostrara promissora em reproduzir a literatura no âmbito da ubiquitinação, apresentou resultados contraditórios e pouco reprodutíveis quando avaliada na atividade proteolítica.

De forma geral, a avaliação da contribuição do sistema ubiquitina-proteassoma no quadro de inibição da importação de proteínas mitocondriais, por ambas as maneiras propostas por *Wrobel et al*. gerou resultados pouco reprodutíveis tanto em relação ao observado em leveduras, quanto observado com a repetição dos experimentos em H9c2. Portanto, observando-se apenas este fenótipo isoladamente, não obtive evidencias necessárias para sustentar a hipótese de que a UPRam é conservada em células de mamíferos. Contudo, também deu-se importância para a modulação do estado global de síntese proteica.

O bloqueio da síntese proteica global na UPRam

Conforme reconhecidos pelos autores, o “outro braço” da UPRam seria o bloqueio global da síntese proteica. Valendo-se dos aminoácidos metionina e cisteína marcados com enxofre radioativo (^{35}S), os autores identificaram uma menor taxa de incorporação em leveduras que apresentavam um defeito na maquinaria de importação de proteínas mitocondriais, realizando uma simples autorradiografia do lisado proteico separado por PAGE. Apesar de ser uma técnica simples, o trabalho com material radioativo requer uma série de equipamentos pouco disponíveis, bem como muitos cuidados contra contaminação de pessoal. Uma alternativa fiel e mais conveniente, que se baseia nos mesmos princípios é o ensaio de incorporação de puromicina.

A puromicina é uma molécula produzida naturalmente pela bactéria *Strptomyces alboniger*, e possui grande semelhança estrutural ao tRNA-acilado (isto é, carregado com um aminoácido). Devido a esta característica, é prontamente associada às cadeias polipeptídicas crescentes quando

administrada no meio de cultura celular, provocando a interrupção do elongamento da cadeia e permanecendo covalentemente associada a ela (37).

Tirando vantagem deste ultimo detalhe, pesquisadores desenvolveram um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer estes adutos puromicina-polipeptídeo, e desenvolveram um método para estimar a taxa de síntese proteica em organismos vivos, com a mesma eficácia do método de incorporação de aminoácidos marcados radioativamente (38).

Decidimos então empregar esta tecnologia para verificar se a modulação do sistema ubiquitina-proteassoma observada com o tratamento com MitoBloCK-6 era acompanhada também de alguma variação na taxa de síntese proteica das células. Desta forma, expus as células aos mesmos dois períodos de pulse (duas ou quatro horas) com 20 ou 50μM da droga. Os resultados podem ser verificados na figura 10.

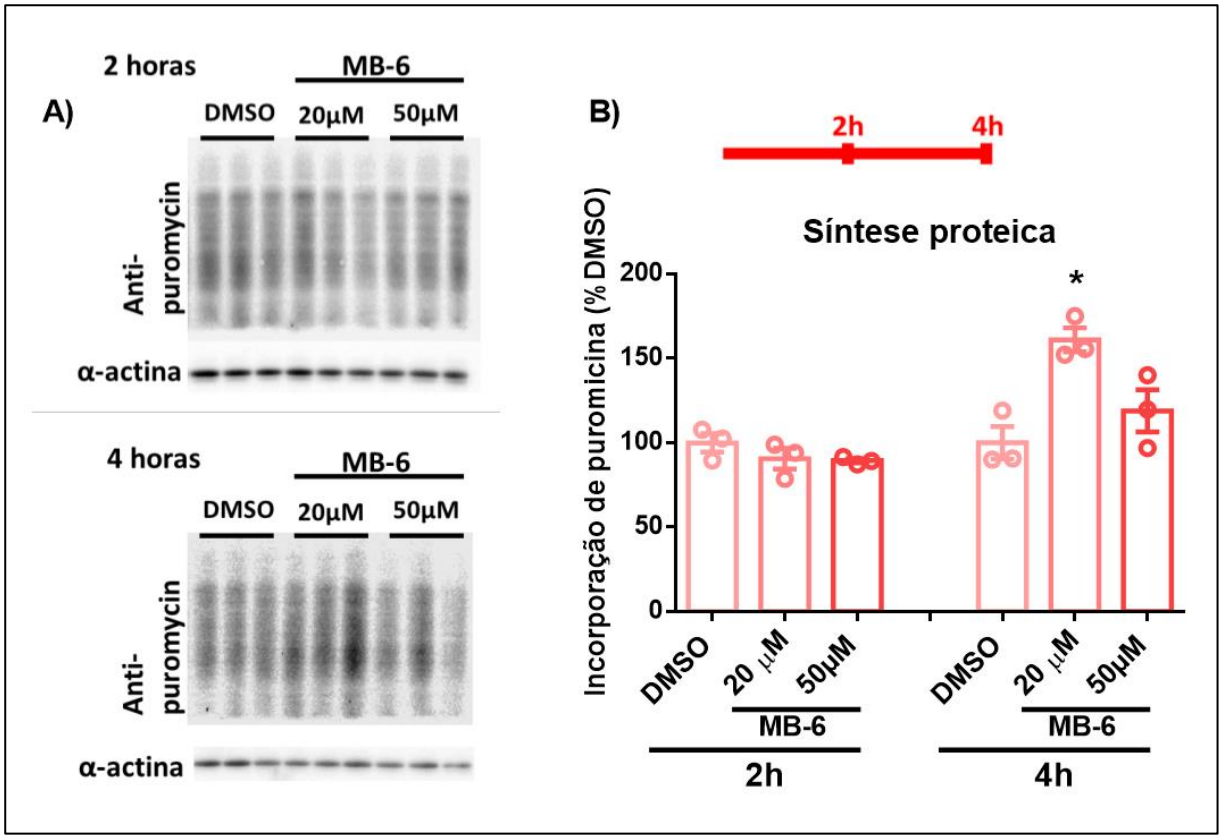

Figura 10: Incorporação de puromicina após duas (cima) ou quatro (baixo) horas do tratamento com MitoBloCK-6 com diferentes doses (A). B) Quantificação dos *Western blots* do item A). *p<0,05 em teste t vs DMSO.

Conforme apresentado no Western blot contra puromicina (Fig 10A), a quantificação da taxa de síntese proteica (Fig 10B) sofre alteração apenas com o tratamento com 20μM de MitoBloCK-6 durante quatro horas. Esta variação para cima (isto é, aumento de síntese) é exatamente o oposto do esperado caso a via em questão estivesse ativada. Não obstante, nenhum tratamento com esta molécula fora capaz de provocar uma diminuição nesta taxa, tendo ele modulado o sistema ubiquitina-proteassoma ou não. Desta forma, a investigação deste fenótipo também não contribuiu para a confirmação de nossa hipótese.

Na tabela 2 estão sumarizados os fenótipos observados em *S. cerevisiae* que deram nome à UPRam (em verde), e ao lado, os resultados obtidos em minha investigação, pelo menos até então.

	UPRam	**CCCP**	**MitoBloCK-6**
Acúmulo no citosol	*pulse*	*pulse*	N.I.
Ubiquitina	↑ *pulse*	-	-
Proteassoma	↑ *chase*	-	↑ *pulse*
Bloqueio de síntese	*pulse*	N.I.	-

Tabela 2: fenótipos reportados pela UPRam em Saccharomyces cerevisiae (em verde) e os encontrados após tratamentos com CCCP ou MitoBloCK-6 em H9c2. Em vermelho, resultados contrários ao esperado. N.I. Não Investigado.

Fica evidente, neste quadro comparativo, que os resultados obtidos não suportam a hipótese de que a UPRam é conservada em mamíferos. Quando estes resultados foram levados para a banca de qualificação foi unânime a opinião de que o trabalho não deveria ser tocado adiante, mas decidimos, mesmo assim, dar uma ultima chance pontual à esta linha de investigação valendo-se de uma característica interessante do particular modelo de estudo.

Como discutido anteriormente, as células da linhagem H9c2 são mioblastos derivadas do ventrículo de embrião de ratos, e conservam várias características do tecido muscular. Contudo, estas células ainda podem ser diferenciadas, assumindo, depois de 5 dias (mantidas em alta confluência, sob redução de soro, e na presença de *all-trans retinoic acid* (RA) 10nM) um fenótipo mais alinhado ao do tecido cardíaco adulto (fenótipo *cardiac-like*). Quando diferenciadas, estas células apresentam um aumento na expressão de

genes relacionados ao metabolismo mitocondrial, bem como da proteína PGC1-α (*Peroxissome proliferator-activated receptor gamma coativator 1-α*) considerada um importante regulador da biogênese mitocondrial (34). Desta forma, hipotetizamos que, uma célula contasse com uma massa mitocondrial maior apresentaria maior *turnover* de proteínas mitocondriais, e uma maior sensibilidade aos sinais emitidos pela organela. Assim, investiguei os mesmos fenótipo supracitados nas células em seu estado diferenciados. É importante ressaltar que à partir deste momento, todos os experimentos relatados à seguir foram realizados em H9c2 diferenciadas.

Para não adicionar mais uma figura com resultados negativos, preferi apenas relatar que os mesmos resultados observados anteriormente em H9c2 não diferenciadas foram verificados nas células comprometidas com o fenótipo *cardiac-like*. Contudo, uma série de fenômenos até então não observados foram verificados neste novo modelo, e deram subsídios para a continuação da minha investigação, mesmo que em um sentido diferente do que estava sendo tocado. Estas novas observações serão abordadas nos próximos tópicos, de forma que todo o conteúdo presente nas páginas remanescentes deste documento teve origem das observações inesperadas e interessantes que serão relatadas mais para frente.

Antes de encerrar este tópico sobre a conservação da UPRam em células de mamíferos, é importante sanar uma dúvida que permaneceu não respondida até então: Porque os plasmídeos codificando as proteínas de fusão PDF-Citrine e trPDF-Citrine foram capazes de proteger as células contra o dano de H/R?

No esforço de validar a eficiência do plasmídeo, realizei *Western blots* tanto contra PDF quanto contra citrine, e não consegui ver nenhuma diferença na expressão destas proteínas entre as células que foram transfectadas e as que foram tratadas com lipofectamina (controle de veículo). O anticorpo contra citrine não reconheceu nenhuma banda em nenhuma das amostras, ao passo que o anti-PDF conseguiu apenas reconhecer a proteína endógena (sem a adição do peso da citrine). Desta forma, conclui que, ou o protocolo de transfecção do fabricante de lipofectamina não estaria funcionando em H9c2,

ou havia algo de errado com os plasmídeos clonados por um de nossos colaboradores.

Como o protocolo de transfecção já fora usado várias vezes nesta linhagem celular em outros projetos, resolvi verificar a adequação da sequencia codificada no plasmídeo. Após reconstituir os passos *in-silico* (isto é, no computador) da estratégia de clonagem utilizada, verifiquei que devido a um erro no desenho dos *primers* de clonagem, havia uma deleção de uma base entre os códons da PDF e os códons de citrine.

Esta deleção de apenas uma base é conhecida por gerar uma alteração no quadro de leitura dos códons seguintes, o que provoca a total desconfiguração da proteína de fusão à partir de PDF. Embora possa ser possível que o plasmídeo esteja de fato produzindo ainda a proteína PDF com uma mera adição de novos aminoácidos aleatórios, proteínas sem sentido são muitas vezes instáveis, tendo como destino a degradação ou formação de agregados. Desta forma, é provável que dentro do citoplasma, este plasmídeo seja silenciado ou então os polipeptídeos oriundos de sua expressão estejam sendo prontamente desintegrados, justificando a não identificação de PDF nestas células transfectadas.

Assim, ficou claro que o plasmídeo não estava desenhado corretamente, mas então porque mesmo assim ele conseguiu proteger contra o dano de H/R? Bom, talvez a resposta esteja não nos grupos experimentais em si, mas no controle utilizado no ensaio. A menor morte celular observada após o protocolo de H/R foi expressa em % do controle, que eram células tratadas com lipofectamina, sem o controle ideal que seria o próprio plasmídeo de expressão vazio (isto é, sem a proteína clonada). Desta forma, uma explicação possível é de que alguma outra proteína relacionada ao funcionamento do plasmídeo, ou então a própria utilização dos componentes destes ácidos nucleicos como nutrientes durante o protocolo de hipóxia reoxigenação tenha provocado os efeitos observados.

Assim, conforme os resultados obtidos na investigação até aqui, decidimos que seria mais interessante procurar novos horizontes no presente trabalho ao invés de insistir neste modelo que não estava rendendo frutos.

Como consequência, voltei minhas atenções aos curiosos fenômenos observados nos experimentos envolvendo o tratamento das células diferenciadas que serão relatados à seguir.

Visando observar a emergência da UPRam neste novo modelo celular, usei como base o conhecimento gerado com as células H9c2 indiferenciadas, e assim acompanhei as células em um *pulse* de 2 horas com 20μM de CCCP, bem como pelos períodos de 30, 60 e 120 minutos de *chase* (conforme figura 11A), para que fossem investigados os fenótipos relevantes da via em questão.

Interessantemente, ao tentar identificar a banda pesada da proteína mitocondrial OPA-1 (que apresenta 10kDa a mais que a proteína nativa), acabei verificando um padrão muito diferente do esperado. Ao invés de encontrar o fragmento mais alto, acabei verificando a clivagem de uma das bandas desta proteína (Fig. 11B). Até este momento eu não sabia nada a respeito desta proteína especificamente, apenas sobre seu papel na fusão mitocondrial e que seu padrão de expressão pode gerar até 5 bandas de alturas diferentes num *Western blot*, dependendo do tecido (39). Sua clivagem mediada pelo tratamento com CCCP era um fato novo, que não seria prontamente esmiuçado se constasse como um fato isolado.

O detalhe que mais me chamou a atenção não foi verificado em análises bioquímicas, mas sim ao microscópio ótico. Para a minha surpresa, ao final do momento de pulse as células apresentaram enormes vacúolos ao redor do núcleo (Figura 11C.I), que se assemelham muito com vacúolos presentes em células em apoptose (*membrane blebbing* e *apoptotic bodies*) (40). Se isso fosse verdade, a investigação poderia parar por ai, já que eu jamais observaria uma via citoprotetora num quadro de unânime morte celular. Mesmo assim, decidi por continuar o experimento da maneira como havia sido proposto, e, ao continuar observando a morfologia celular nos períodos de chase, foi notável a progressiva atrofia destes vacúolos, que chegam a sumir após 2h de recuperação (figura 11 C*II* a C*IV*).

Este fenômeno indica que, ao invés de estarem organizadas para sustentar um programa de morte celular, as células estava de alguma maneira

se protegendo contra o stress causado pelo desacoplador, dado que, com a retirada do estímulo, a resposta foi também mitigada.

Mas porque uma resposta transiente pode ser entendida como valiosa sob um olhar biomédico? É uma característica inerente à vida a capacidade de reagir e se adaptar a estímulos adversos provenientes do meio interno ou externo à célula (e essa característica se manifesta também em outros níveis de organização, como o sistêmico, individual ou até ecológico, porém não pretendo me estender às particularidades do fenômeno compreendendo níveis supra celulares). Muitas vezes estes estresses, se provocados em intensidades subletais, são capazes de desencadear uma resposta protetora no organismo envolvendo a ativação de vias celulares de defesa, ao que se chama de resposta compensatória (ou em inglês *rebound response*). Ainda mais importante, estas respostas são capazes de gerar uma memória temporária durante a qual o organismo se demonstra mais resistente ao estresse, podendo ele ser de mesma natureza ou não daquele que iniciou a resposta. A este fenômeno foi dado o nome de Hormese, e este conceito já foi amplamente verificado em diversos modelos experimentais e cotidianos (41), como por exemplo, o modelo de pré-condicionamento isquêmico do coração ao infarto (18) ou o hábito de consumo diário de vinho das populações mediterrâneas (provável motivo pelo saldo positivo do popularmente conhecido “paradoxo francês”) (42).

Assim, seria possível que esta resposta celular ao CCCP fosse capaz de deixar a célula em um estado “defensivo”, em que ela se apresentaria resistente a outros tipos de estresse, talvez até ao de hipóxia-reoxigenação. Para testar esta hipótese, submeti as células H9c2 em dois diferentes estágios da resposta (imediatamente após 2h de pulse ou após 2h de chase, com DMSO ou CCCP) ao protocolo *in vitro* de H/R, verificando os níveis de morte celular após duas horas de reoxigenação. Os resultados foram dispostos de duas formas distintas, sendo em morte absoluta (% das células mortas em cada grupo experimental) em 11D, ou em morte relativa ao veículo (11E). Como a segunda forma se mostra mais simples ao leitor, e permite uma leitura mais rápida, esta foi escolhida para ser apresentada no restante do trabalho, e

assim serão dispostos os dados logo após a explicação acerca desta conversão dada a seguir.

No gráfico da figura 11D, cada par de barras pretas e brancas resume quanto o procedimento de H/R foi capaz de matar células em cada condição. Assim, as diferenças que interessam à esta investigação se dão entre as

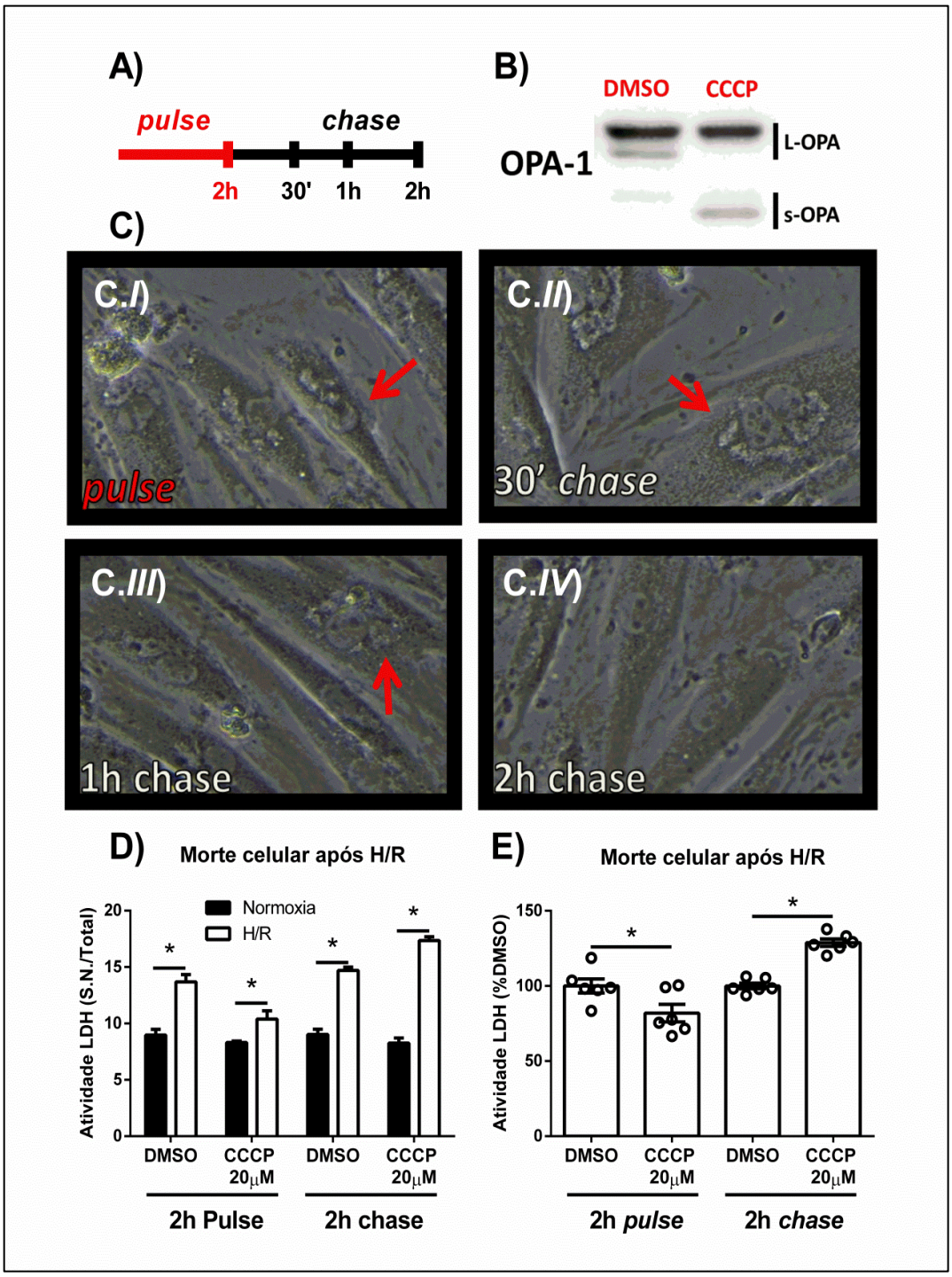

Figura 11: A) Esquema representativo do curso temporal utilizado nas fotografias do item C. B) Padrão observado da proteína OPA-1 após 2h de pulse com DMSO ou CCCP 20μM. C) Fotografias retiradas no microscópio ótico com o aumento de 200X nos períodos indicados em A. D) Morte celular desempenhada após protocolo de H/R tendo como pré tratamento os indicados no eixo X. E) Dados transformados em % do grupo DMSO. *p<0,05 em teste T vs DMSO.

diferenças existente em cada par de barras. Tomemos apenas o grupo submetido ao pulse antes de H/R como exemplo: o grupo tratado com DMSO sofreu uma morte 40% maior do que a observada em células em normóxia. Quando o tratamento foi realizado com CCCP, a morte desenvolvida pelo mesmo protocolo de H/R diminui para valores 20% menores. Esta porcentagem do grupo experimental em relação ao controle de veículo foi compilada no gráfico de 11E, que facilita o entendimento do processo.

Desta forma, fica claro que, se as células são submetidas ao protocolo de H/R no momento em que apresentam os vacúolos completos, elas estão protegidas contra o dano do protocolo, apresentando uma menor morte celular (figura 11E, 2h *pulse*), ao passo que, se esta resposta celular já tiver sido cessada no momento da submissão ao protocolo, as células acabam por morrer ainda mais que o próprio controle do veículo (figura 11E 2h *chase*).

Apesar do resultado negativo acerca da conservação da UPRam em mamíferos, de uma maneira não intencional consegui verificar uma forma, até então inédita para mim, de se proteger células cardíacas do insulto de hipóxia/reoxigenação. No momento em que o trabalho se encontrava, logo após a qualificação em que fui aconselhado a procurar novos horizontes, este novo fato pareceu digno de investigação, visto que se tratava de uma observação original, interessante do ponto de vista biomédico, e pertinente ao intuito inicial do trabalho (desenvolvimento de uma nova estratégia de defesa contra o dano de H/R).

Dada a mecanística deste tratamento, isto é, visto que ele precisa ser efetuado antes do insulto de H/R para que gere a proteção observada, torna-se mais interessante estrategicamente descobrir qual resposta biológica está sendo ativada pelo tratamento, para que possam ser desenvolvidas moléculas ativadoras que terão como promessa mimetizar a proteção observada neste modelo. O objetivo deste trabalho a partir daqui tornou-se então responder a seguinte pergunta: <u>Qual é a resposta biológica ativada pelo desacoplador, que é capaz de conferir resistência ao dano de H/R?</u>

A própria pergunta já carrega sutilmente uma informação importante. Ao formular com qual é a resposta, implicitamente admito que o desacoplador é

capaz de provocar um grande número de reações celulares, como de fato já fora mencionado anteriormente neste documento. Assim, no início desta nova etapa, foi importante a confirmação deste fenômeno em experimentos independentes, e também a coleta do maior número de pistas possíveis sobre o que estava acontecendo com estas células.

Assim, trouxe na figura 12A uma compilação de todos os experimentos em que o grupo CCCP pulse 20μM foi inserido antes do protocolo de H/R, e com este grande volume de dados fica evidente que este é uma estratégia robusta, reprodutível, e capaz de reduzir em média, em 33% a morte celular imprimida pela hipóxia/reoxigenação. A este fenômeno dei o nome de CIP (do inglês CCCP *induced pre-conditioning*), e assim será referido à partir de agora.

Para minha surpresa, este fenômeno já havia sido descoberto no ano de 2000 com o uso de outra molécula desacopladora, o 2,4-Dinitrofenol (DNP). O tratamento com este composto na concentração de 50μM foi eficaz em diminuir a área de infarto de corações isolados submetidos ao protocolo de isquemia/reperfusão no aparato de langendorff, e sua eficiência foi comparável ao do protocolo padrão ouro de pré-condicionamento, o pré-condicionamento isquêmico (43). Em outro estudo esta proteção foi inibida por ciclosporina A, o que sugere que ela seja dependente da abertura do poro de transição mitocondrial (mPTP), contudo, esta droga é conhecida por se ligar e modular um número imenso de outras proteínas (44), o que levanta incertezas quanto a acurácia deste mecanismo proposto. Além disso, a cardioproteção induzida por desacopladores também fora verificada com uma terceira molécula, o FCCP, mas que diferentemente do observado com DNP, ela só foi capaz de proteger o coração em doses extremamente baixas, em que a capacidade desacoplador não era verificada (45), de uma maneira independente de mPTP e dependente de ROS (46).

Não consegui encontrar nenhum trabalho que tivesse descrito esta proteção mediada especificamente por CCCP e, visto que estas moléculas ditas desacopladoras podem apresentar doses e mecanismos distintos para a cardioproteção, decidimos apostar que esta resposta desencadeada pelo CCCP era então inédita. Um bom indício disso é a presença destes

proeminentes vacúolos, que não foram reportados em nenhum dos trabalhos encontrados na literatura.

Inicialmente, para tentar entender qual era a resposta desencadeada que culminava com CIP, apostei que ela seria de alguma maneira relacionada aos incomuns vacúolos que estas células apresentaram durante o pulse com CCCP, já que eles irrefutavelmente indicaram ser fruto de uma resposta biológica ao estresse. Dada a disposição perinuclear dos vacúolos, elenquei como um dos candidatos envolvidos o retículo endoplasmático, mas a expressão do marcador de estresse de retículo GRP78 não se mostrou aumentada em nenhuma das condições analisadas (dados omitidos). O mesmo resultado foi obtido para caspase 3 clivada (marcador da via apoptótica).

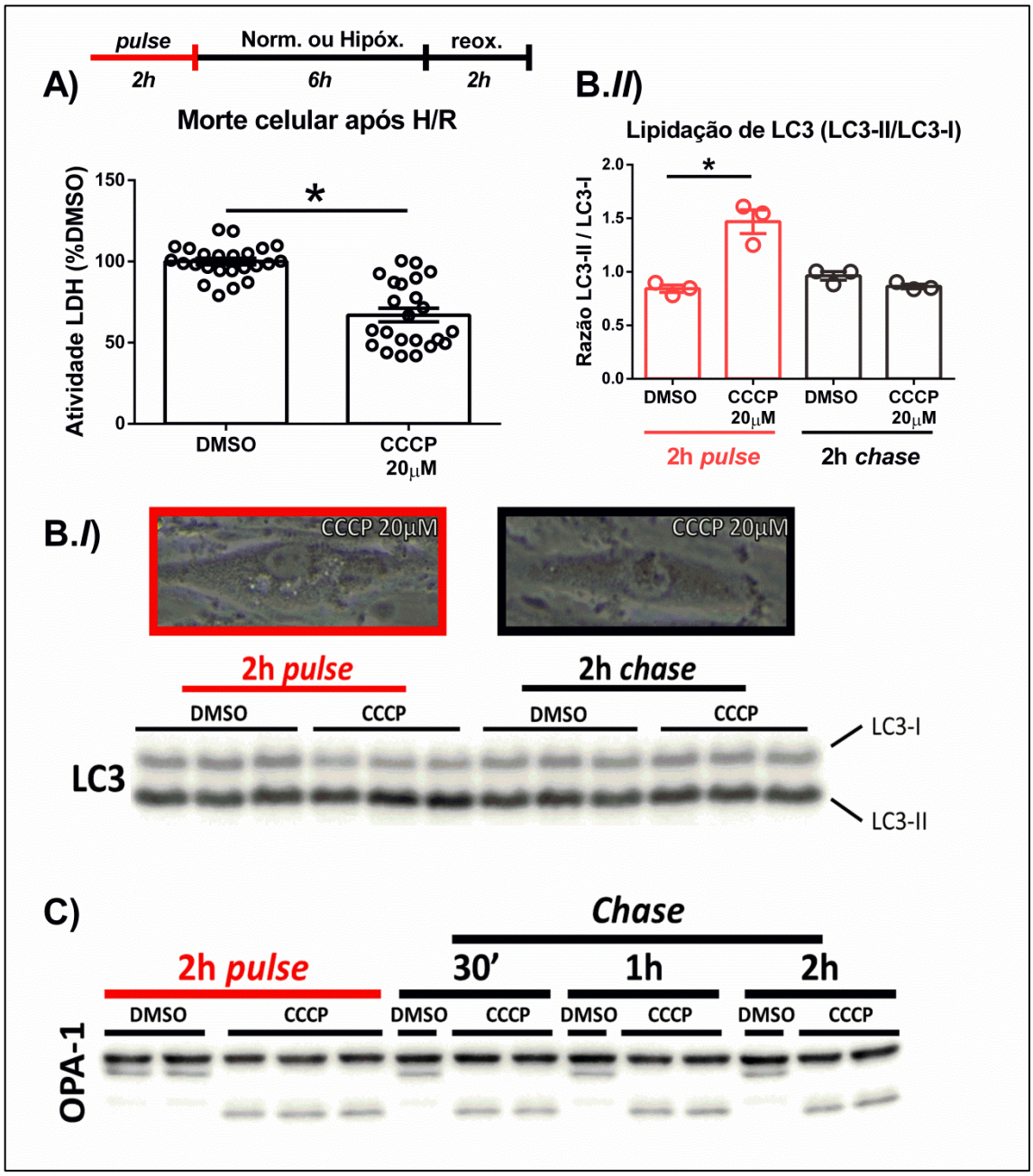

Figura 12: Compilação de todos os resultados acerca da morte celular desenvolvida após protocolo esquematizado acima A). BI) estado de LC3 nos momentos de 2h *pulse* e 2h *chase*, conforme imagem das células acima. BII) quantificação da lipidação de LC3 em cada um dos dois momentos propostos. C) Padrão de clivagem de OPA-1 ao longo de 2h *pulse* ou diferentes momentos de *chase*. *p<0,05 em teste t vs DMSO.

Outra resposta biológica que possui vacúolos como componente principal é a via lisossomal autofágica. A via em questão é uma das principais vias de degradação da célula, sendo capaz de destruir desde porções mínimas do citoplasma contendo proteínas, até grandes componentes celulares como organelas inteiras. Em linhas gerais, em ambos os processos o início se dá pela formação de um vacúolo chamado autofagossomo, que engloba a porção

citoplasmática que será alvo de degradação, que posteriormente se funde à um lisossomo onde ocorrerá a degradação de seus componentes. Neste contexto se insere a proteína LC3.

LC3 existe dentro da célula em duas diferentes formas, uma longa, chamada de LC3-I, é vista como a proteína não ativada, representando o *pool* disponível para uso que não está associada ao autofagossomo. Durante a indução da resposta autofágica a proteína LC3-I é recrutada para o autofagossomo, momento em que sofre uma lipidação e clivagem, sendo então incorporada à esta nova estrutura. A proteína de cadeia leve (chamada de LC3-II) permanece associada ao autofagossomo até o momento final de degradação lisossomal, que culmina com a destruição da LC3-II. Uma das muitas maneiras de se analisar o estado da autofagia na célula é o da quantificação da razão LC3-II/LC3-I, que reflete em um determinado momento, quanto de LC3 está sendo mobilizada para a resposta autofágica. Esta proteína é considerada o marcador mais confiável da ativação da via autofágica.

Assim, como evidenciado pelo *Western blot* contra LC3 na figura 12BI, uma maior lipidação é provocada no momento do *pulse* com CCCP em comparação ao DMSO, justamente no momento em que os vacúolos estão em seu tamanho máximo. Esta diferença some (Fig. 12BII) quando os mesmos vacúolos somem (12BI) no momento de 2h *chase*. Esta associação entre o padrão de lipidação de LC3 e o estado dos vacúolos observados ao microscópio ótico sugere que estes vacúolos poderiam ser vacúolos autofágicos. Para tentar validar esta hipótese, tentei verificar se em uma imunofluorescência a proteína LC3 se colocalizaria com estas estruturas celulares, mas não obtive sucesso por questões técnicas.

Ficou claro então o comportamento bimodal da resposta autofágica durante o experimento de pulse-chase com CCCP, e interessantemente, no momento em que o tratamento se mostrou efetivamente protetor (Fig. 11E), a autofagia se demonstrou coincidentemente ativada. Em seguida, conforme o chase se demonstrara deletério no quadro de H/R, a autofagia estava desativada em relação ao controle. Estes fatos culminaram na sugestiva

hipótese de que a autofagia pudesse ser a resposta responsável pela conferencia de CIP.

Quanto ao padrão observado em OPA-1, é notável que, além de observado prontamente no momento de *pulse*, o padrão permanece sustentado até duas horas após a retirada da droga (Fig. 11C). Este sinal, apesar de presente também no momento em que a resposta não é mais protetora, pode mesmo assim ter um papel importante na conferência de CIP, pois pode ser parte de uma sinalização celular mais complexa do que meramente a clivagem de uma única proteína. De fato, a clivagem de OPA-1 se relaciona com a via lisossomal autofágica, numa modalidade específica chamada de mitofagia.

A mitofagia é maneira com a qual a célula consegue reciclar mitocôndrias com componentes irreparavelmente danificados, e seu principal gatilho para identificar estas organelas defeituosas é justamente a queda do potencial de membrana (47). Esta diminuição culmina, entre outras coisas, na clivagem de OPA-1 e consequentemente a fragmentação mitocondrial, etapa necessária para que as porções danificadas sejam englobadas pelos autofagossomos. Além disso, estudos recentes tem sustentado uma alta associação espacial entre mitocôndrias e o retículo endoplasmático, que inclusive participa fisicamente da tarefa de fissão mitocondrial (48). Esta co-localização ao redor do núcleo justificaria então a presença de vacúolos mitofágicos nesta região. Mais detalhes do processo serão discutidos nos próximos tópicos do trabalho.

Motivado por estas associações entre o tratamento resultante em CIP e os indícios de envolvimento da autofagia nestas condições, decidi esmiuçar mais a contribuição desta via no meu modelo, e o resultado desta jornada é apresentado nas páginas seguintes.

O sistema lisossomal-autofágico como mecanismo mediador de CIP

O experimento relatado na figura 12B da mera verificação do estado de lipidação de LC3 nas amostras submetidas ao tratamento com CCCP não é por si só, uma prova irrefutável da ativação da via autofágica, por um motivo de

fácil compreensão. A quantidade de LC3-II presente num determinado momento dentro da célula sempre será um produto de dois processos celulares que acontecem continuamente dentro da célula: a lipidação de LC3-I e a degradação de LC3-II no interior dos lisossomos. Assim, uma leitura que indique maior presença de LC3-II em relação à LC3-I pode ser fruto tanto de maior lipidação (que seria de fato a maior ativação), quanto uma menor degradação (o que é conotado por um bloqueio de fluxo autofágico). Para contornar tal problema, é comum o uso de ensaios de fluxo autofágico empregando-se um inibidor da degradação lisossomal nos diferentes tratamentos experimentais (49). Com a inibição da degradação durante o período de interesse, é possível assegurar que a LC3-II observada neste cenário será fruto apenas do processo de lipidação, permitindo que o ensaio vislumbre apenas a ativação da autofagia.

Portanto, com o objetivo de validar o resultado obtido acerca da lipidação de LC3, induzi as células a formar os vacúolos utilizando 20μM de CCCP, na presença ou não do inibidor da degradação lisossomal Cloroquina (50μM) durante duas horas. Esta droga é capaz de se difundir para o interior de lisossomos onde se torna protonada, aumentando, portanto, o pH lisossomal, e assim inibindo a atividade das enzimas hidrolíticas (entre elas, proteases) residentes dessa organela (que dependem do pH ácido para seu funcionamento ideal). Após o tratamento as células foram lisadas e um *Western blot* para a proteína LC3 foi realizado, como evidenciado na figura 13

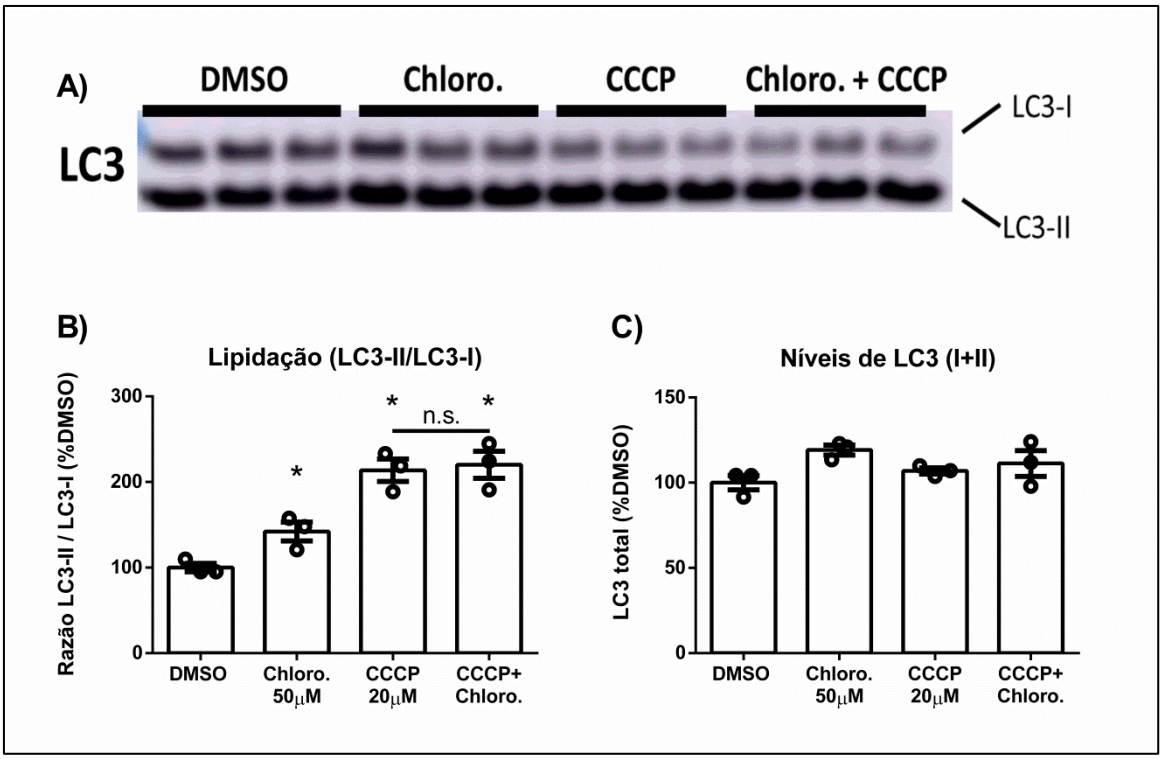

Figura 13. A) Western blot para LC3 para cada tratamento referente ao ensaio do fluxo Autofágico durante um tempo de *pulse* de 2 horas. B) Quantificação da razão LC3-II/ LC3-I conforme os tratamentos. C) Níveis de LC3 total (I+II) normalizados pelo ponceau. *p<0,05 em teste t vs. DMSO.

O ensaio de fluxo autofágico deixou claro alguns aspectos sobre o funcionamento do sistema lisossomal-autofágico durante a indução dos vacúolos. Em primeiro lugar, é notória uma grande mobilização da LC3-I para LC3-II, observável tanto na figura 13A quanto na quantificação razão II/I (13B), quando as células são tratadas com CCCP. Este resultado é interessante pois demonstra que o modelo é reprodutível, muito embora o aumento observado tenha sido ainda maior do que o verificado no experimento anterior. O tratamento com cloroquina por si só já fora capaz de aumentar ligeiramente a lipidação de LC3, além de conseguir elevar os níveis gerais da proteína (13C). A lipidação promovida pelo tratamento apenas com cloroquina é interpretado como o fluxo autofágico basal que fora desempenhado por estas células neste período de tempo de 2 horas, e apresenta-se em um nível bem inferior ao obtido com o tratamento com CCCP isoladamente.

Porém, o mais interessante resultado se dá com a adição de CCCP concomitante à cloroquina. O aumento da lipidação alcançado por CCCP não

consegue sofrer um efeito aditivo quando o tratamento é somado à inibição da degradação lisossomal. Isso significa que a lipidação de LC3 atingiu seu máximo fisiológico, e que o fluxo autofágico está sendo limitado pela própria taxa de degradação lisossomal. Portanto, podemos concluir que este tratamento de 20μM de CCCP induzido por 2 horas em H9c2 se mostrou um potente ativador da resposta autofágica, que atingiu seu limite fisiológico na fase de indução.

O estudo da autofagia no cenário da Isquemia/reperfusão já conta com um bom número de trabalhos, mas que em muitos tópicos está guarnecido por resultados conflitantes. O aumento da autofagia já foi verificado em algumas doenças cardiovasculares, como na insuficiência cardíaca e no infarto do miocárdio (50), porém ainda se discute se este fenômeno é uma compensação adaptativa ou uma consequência deletéria oriunda do dano de I/R.

No campo experimental, duas vertentes antagônicas explicam o perfil adotado pela via autofágica durante o estágio da isquemia. A primeira verifica que com a depressão metabólica gerada com a diminuição do aporte de oxigênio e nutrientes (supressão da respiração celular), a proteína *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) é ativada, e media a ativação da autofagia. Tanto fosforilando e inibindo mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex* 1) e ativando ULK (*Unc51 like autophagy activating kinase* - conhecida como “kinase ativadora da autofagia”), AMPK iniciaria a cascata de ativação da autofagia, que culmina com a degradação de organelas e proteínas danificadas, reciclando pequenos componentes celulares que podem ser utilizados como fontes de energia, suprindo a demanda gerada pelo colapso metabólico (51, 52). Apesar desta linha de investigação, também já fora reportado que durante a isquemia, a via autofágica estaria suprimida tanto na parte de indução quanto na de degradação lisossômica (53), e que sua estimulação seria benéfica.

Durante a reperfusão, embora não seja mais observada a ativação de AMPK, a via autofágica segue aumentada, mas desta vez motivada pela influencia de outra personagem, a proteína Beclin1, que se apresenta superexpressa neste quadro. Esta proteína é responsável por interagir com

uma série de proteínas (como VPS 15, VPS34, Bcl-2, UVRAG, etc.) coordenando diferentes fases da construção de um autofagossomo (nucleação, elongação e maturação) (52). A maior expressão de Beclin resulta na maior ativação da autofagia no momento da reperfusão.

Quanto à contribuição da via autofágica para a redução ou exacerbação do dano da H/R, também há controvérsias. Em HL1 (linhagem imortalizada de células do músculo cardíaco de camundongos), a ativação da autofagia com rapamicina (inibidor de mTOR) se demonstrou capaz de diminuir a morte celular apoptótica, e o oposto se observou com a inibição da via autofágica com worthmanin ou 3-MA (3-metiladenina), dois inibidores de PI3 kinase (53). Por outro lado, em células de cultura primária de cardiomiócitos de ratos adultos e neonatos, a inibição da autofagia pelo *knock down* de Beclin, ou por 3-MA, foi capaz de atenuar a morte celular induzida por H/R (54). Vale ressaltar que todas essas modulações farmacológicas regulam sinais upstream autofagia, e consequentemente, afeta diversos outros processos celulares, independente de autofagia. Nesse caso, moduladores mais seletivos e diretos de autofagia são necessários, porem ainda indisponíveis.

Além de estudos compreendendo o status da autofagia no processo de H/R, também já foi estudada a relação entre o desacoplamento mitocondrial e a autofagia. O uso de CCCP é capaz de ativar a autofagia de diferentes formas. Primeiramente, foi demonstrado que CCCP é capaz de gerar uma resposta celular que culmina com a estabilização e ativação de ULK (55) por uma maneira independente de AMPK (36), provocando a ativação da via autofágica em um ponto *upstream*. Além disso, a queda do potencial de membrana mitocondrial provoca o acumulo de pink e Parkin em sua superfície, o que culmina com posterior ubiquitinação e degradação da organela no interior de lisossomos, numa modalidade de autofagia específica da mitocôndria, chamada de mitofagia (47).

Também já é conhecida a capacidade do CCCP de promover fragmentação mitocondrial, processo necessário para a compartimentalização de mitocôndrias disfuncionais no interior de autofagossomos. Mitocôndrias são organelas cuja morfologia se apresenta em uma rede dinâmica, sendo que os

processos de fissão (uma organela se separando em duas) e fusão (duas organelas se unindo em uma) acontecem o tempo todo. Diferentes estímulos celulares podem favorecer um processo em detrimento de outro, fazendo com que a rede mitocondrial se apresente numa conformação mais fusionada ou mais fragmentada (56). A queda do potencial da membrana mitocondrial provoca, entre outros inúmeros eventos, a clivagem da proteína de fusão OPA-1 (*optic atrophy gene* 1) (57), e a polimerização de um anel de constrição ao redor da membrana externa composto por monômetros da GTPase Drp-1 (*dynamin-related protein* 1) (58). Em conjunto, estes eventos desencadeados pelo CCCP acabam por favorecer o processo de fissão mitocondrial, provocando a fragmentação da rede mitocondrial.

Desta forma, visto que CCCP é capaz de ativar a autofagia, e que esta resposta pode estar associada a uma proteção contra o dano de H/R (embora haja controvérsias na literatura a respeito disso), hipotetizamos que CIP teria como mecanismo a ativação da autofagia anteriormente à hipóxia. Esta hipótese faria sentido se levarmos em conta que a mitocôndria é a organela responsável pela geração do dano observado na H/R. A mitofagia quando estimulada antes de H/R poderia ser capaz de diminuir um dos focos de produção de ROS e outras moléculas citotóxicas na reperfusão, reduzindo assim os prejuízos celulares e consequentemente a morte celular.

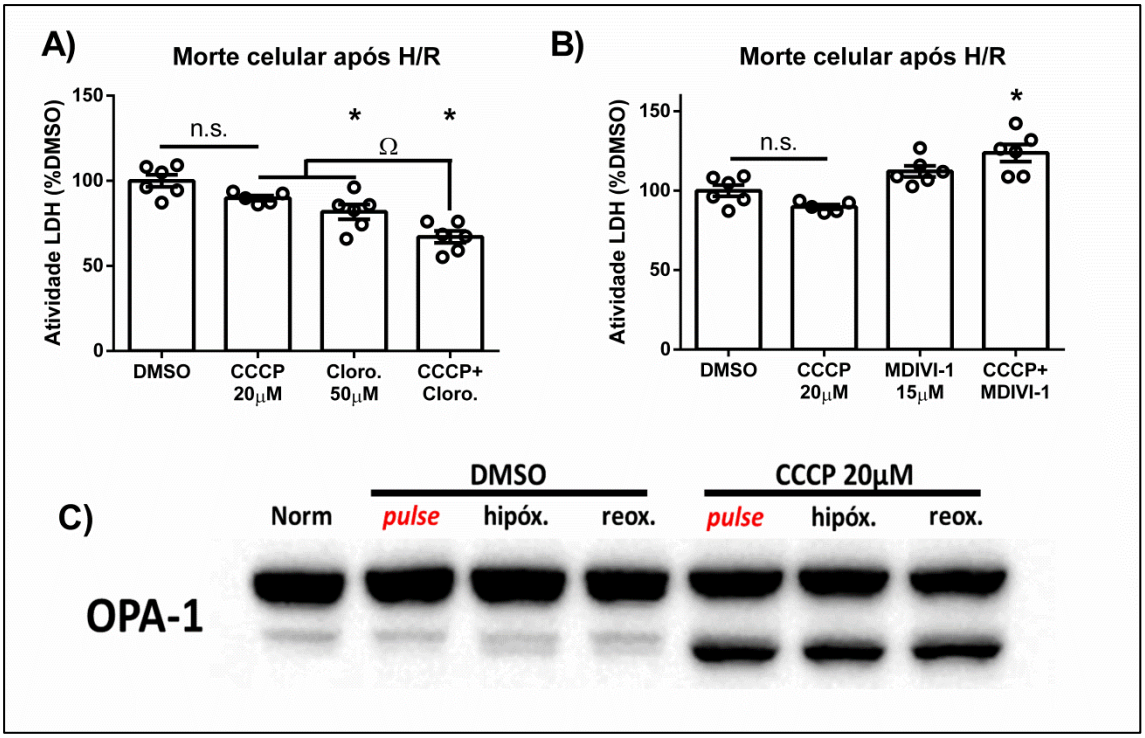

Figura 14: A) e B) Morte celular observada após protocolo de H/R com pré tratamentos indicados ($p<0,05$ em anova uma via seguido de *post hoc* de Turkey). Obs: fármacos utilizados no momento do pulse apenas. C) Padrão de clivagem de OPA-1 nos diferentes momentos do pré-tratamento e do protocolo de H/R, com ou sem adição de CCCP.

Para testar nossa hipótese, verificamos o efeito de dois inibidores da mitofagia no contexto de CIP. O primeiro, cloroquina foi usado para impedir que as mitocôndrias marcadas para degradação fossem destruídas no interior dos lisossomos. O segundo, MDIVI-1 (*mitochondrial division inhibitor 1*) foi usado para inibir a polimerização do anel de Drp-1 (58), impedindo assim a fragmentação mitocondrial (passo necessário para a degradação).

Os experimentos da figura 14 revelaram resultados interessantes, porém parcialmente satisfatórios. Primeiramente, é importante destacar que a proteção induzida pelo pré-tratamento com CCCP não atingiu relevância estatística no teste *post hoc* de turkey particularmente neste ensaio, embora quando verificamos se a proteção ocorreu, independentemente dos demais tratamentos, obtém-se $p=0,03$ em teste t, indicando a eficácia da intervenção. Além disso, é importante ressaltar que os grupos DMSO e CCCP 20μM são grupos em comum entre os gráficos A e B, e portanto os mesmos valores estão repetidos em ambos.

O bloqueio da degradação lisossomal no momento do pulse (grupo cloroquina 50μM) da figura 14A por si só se demonstrou capaz de induzir uma proteção nas células posteriormente submetidas a H/R. Este é um resultado curioso, já que no momento do pulse sem CCCP a via autofágica está operando em seus níveis basais, e vai de desencontro com o trabalho de Hamacher-Brady *et al*. (53), que preconiza que a ativação da autofagia na H/R seria benéfica. Por outro lado, o fenômeno observado se aproxima com a linha sugerida por Valentim et al. (54) de que a inibição da autofagia seria saudável no panorama do dano de H/R.

Contudo, para os fins do nosso teste de hipótese, o mais importante é o efeito do tratamento concomitante de CCCP com cloroquina, que interessantemente provocou um efeito sinergético, aumentando a proteção oferecida por ambos os tratamentos independentemente. Uma vez que o bloqueio (com cloroquina) da degradação das mitocôndrias (provocado por CCCP) não causou a perda de CIP, podemos concluir que a degradação lisossomal não é um processo vital para a conferência de proteção frente a H/R induzida por CCCP, o que significa dizer que a nossa hipótese inicial (de que a remoção de mitocôndrias antes de H/R seria benéfica) estava errada.

Devido a algumas limitações experimentais, como o fato da cloroquina não ser um inibidor específico da mitofagia, e sim da degradação lisossomal como um todo, ou de novos trabalhos indicando uma ação do CCCP diretamente sobre a degradação lisossomal (59), entre outras, não seria muito frutífero explorar ainda mais estes resultados, pois estaríamos adentrando demais no campo das suposições. Contudo, a conclusão de que a degradação de mitocôndrias não seja o mecanismo de funcionamento de CIP permanece relevante frente a estas limitações.

Os resultados compreendendo a inibição da divisão mitocondrial com MDIVI-1 exibem padrões diferentes dos obtidos com cloroquina. A exposição a um pulse com a molécula isoladamente não surte nenhum efeito na habilidade das células de suportarem o dano de H/R (Figura 14B), ao passo que o tratamento conjunto com MDIVI-1 e CCCP demonstra um efeito deletério, isto é, sensibiliza ainda mais as células ao dano. Deste conclui-se que a divisão

mitocondrial representa um passo crucial nos mecanismos operadores de CIP. Neste panorama em que a divisão mitocondrial se mostra importante, mas a degradação não, torna-se promissor investigar este processo pela ótica da dinâmica mitocondrial.

Assim sendo, decidimos verificar a integridade de OPA-1 (já que sua clivagem é um indício de fragmentação da rede mitocondrial) nos diferentes momentos do processo de H/R (figura 14C), e para a nossa surpresa, nenhuma alteração foi observada em condição não tratada (DMSO). Contudo, é marcante a sustentação da presença da isoforma processada ao longo de todos os pontos, depois que se induz sua clivagem no *pulse*. A clivagem de OPA-1, por se demonstrar um sinal sustentado, poderia ser o sinal celular mediador de CIP, já que mesmo 8 horas depois de desencadeado, permanece ativo no momento em que a proteção é verificada.

Com o trabalho contando com estes resultados mencionados até aqui, fiz uma apresentação do andamento do projeto em uma reunião científica que contava com alguns professores renomados na área da pesquisa em fisiologia mitocondrial, e o principal ponto criticado fora a dose utilizada do desacoplador (que segundo estes especialistas seria uma dose muito alta). Motivado por essas orientações, fiz uma titulação de dose do desacoplador visando reduzi-la, e para isto utilizei como leitura o fenótipo mais relevante observado no meu trabalho até então, que foi a conferência de CIP. Desta forma, verifiquei a incapacidade das concentrações de 200nM e 2μM de promover uma redução da morte celular induzida por H/R mediante a um pré-tratamento de *pulse* de 2h. Os resultados podem ser observados abaixo na figura 15A.

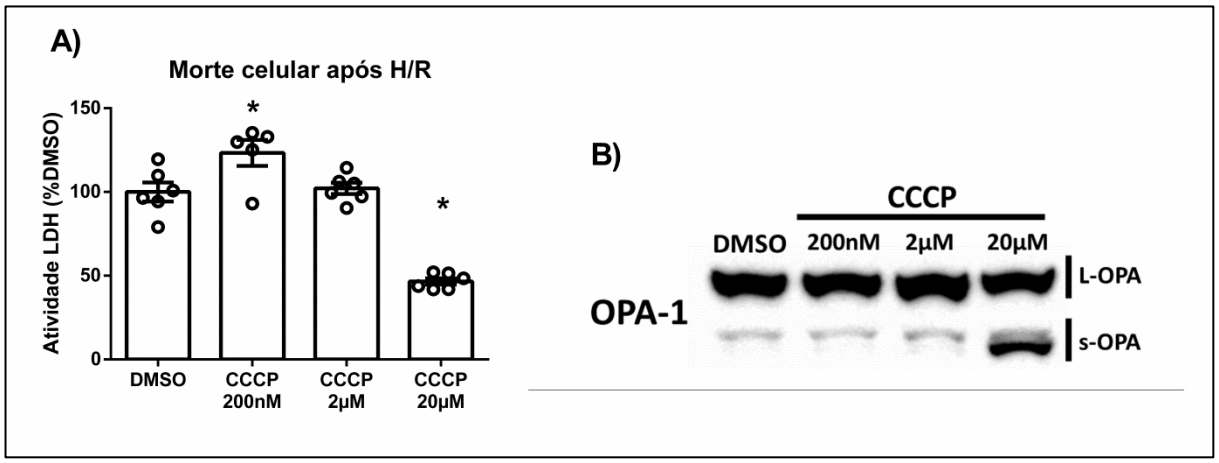

Figura 15: Titulação de dose no modelo estabelecido. A) Efeito das diferentes doses do desacoplador na morte celular induzida por H/R. *p<0,05 em teste t vs DMSO. B) Topologia da proteína OPA-1 após pulse de 2 horas com veiculo ou doses indicadas de CCCP.

A única dose de desacoplador que se mostrou capaz de proteger as células H9c2 do dano de H/R foi a de 20μM, ao passo que as demais não surtiram efeito ou então se mostraram deletérias, o que sugere que algum evento celular (benéfico nestas condições) acontece apenas com estas doses mais elevadas da droga. Uma posterior análise da clivagem de OPA-1 durante um pulse com essas condições (Figura 7B)) evidenciou que coincidentemente, a mesma dose protetora, e apenas ela, foi capaz de provocar a clivagem de OPA-1.

Com a interessante associação entre clivagem de OPA-1 e a proteção contra o dano de H/R, bem como a sustentação deste sinal ao longo de todo o processo (desde o final do pulse até às ultimas duas horas de reoxigenação), tornou-se promissora a ideia de se testar uma possível causalidade entre os fenômenos de clivagem e proteção observados até então.

A clivagem induzível de OPA-1 como mecanismo mediador de CIP

A natureza da proteína mitocondrial OPA-1 vem sendo estudada minuciosamente nos últimos tempos, tanto em condições basais, quanto em sua participação em diferenças doenças, como na atrofia do nervo ótico (da qual deriva seu nome), insuficiência cardíaca ou na isquemia da retina (60, 61). Residente da membrana interna mitocondrial, a proteína se insere na bicamada lipídica uma única vez, e apresenta seu domínio GTPase imerso no espaço inter-membranas (62).

A sequencia genômica de OPA-1 pode ser expressa em 8 diferentes variantes de *splicing*, que, em combinação com a ação de três proteases diferentes, podem gerar um padrão de até cinco bandas de diferentes alturas em um *Western blot*, dependendo do tipo celular analisado (39, 63). Todas as isoformas imaturas possuem uma mesma sequência sinal removível pela ação de MPP (*mitochondrial matrix peptidase*), e são chamadas de isoformas longas (*long OPA* ou L-OPA) após a ação dessa protease. Além disso, a presença ou não dos sítios de clivagem S1 e S2 (presentes nos exons 5 ou 5b, respectivamente) determinam se a isoforma em questão sofrerá clivagens subsequentes pelas proteases OMA-1 ou YME1L, respectivamente. Após clivagem nestes sítios, as isoformas longas se dissociam do domínio transmembrana, tornando-se mais leves (ditas *short OPA* ou s-OPA) e solúveis no espaço inter-membranas. Além disso, uma interessante função relacionada à localização e replicação do DNA mitocondrial fora atribuída à porção de 10kDa de OPA-1 que permanece associada à membrana interna após clivagem de L-OPA em s-OPA (64).

As clivagens de OPA-1 por MPP e por YME1L são constitutivas (65), isto é, são realizadas de forma completa em condições basais, ao passo que a clivagem mediada por OMA-1 ocorre principalmente após indução, seja por dissipação do potencial de membrana, falta de ATP, ou por apoptose (57, 66). Existe atualmente certa polêmica acerca do significado da clivagem de OPA-1 nos sítios S1 e S2, principalmente no âmbito da função que as diferentes isoformas de OPA-1 podem desempenhar na célula nos processos de fusão e fissão mitocondrial. Um trabalho conciliador publicado em 2014 por Anand *et al.*(63) explorou não apenas a função de cada uma das proteases envolvidas neste processamento (com a geração de MEFs *knockouts* para tais proteínas), mas também a de cada fragmento de OPA-1 resultante de processamento na habilidade de promover alterações na dinâmica mitocondrial. Segundo estes autores, as isoformas curtas de OPA-1 “c” e “e” geradas a partir da ação de OMA-1 são capazes de induzir fragmentação mitocondrial, ao passo que as isoformas longas e não processadas são suficientes para promover a fusão mitocondrial. Desta forma, OPA-1 se caracteriza como uma proteína envolvida tanto na fusão quanto na fissão mitocondrial, diferentemente da corrente

anterior que preconizava que a proteína fosse relacionada apenas à fusão, perdendo a função após sofrer clivagem em situações de estresse.

A clivagem de OPA-1 induzida por CCCP já fora descrita na literatura como um reflexo da queda do potencial de membrana (57, 65). No presente trabalho ela se mostrou um sinal sustentado durante todo o processo de H/R e também associada à proteção induzida por CCCP. Com o objetivo de inferir se há uma causalidade entre a clivagem de OPA-1 e a CIP, utilizamos as células HeLa wt ou *knockouts* para YME1L, OMA-1, e para ambas (duplo *knockout*-DKO).

Células MEFs com estas mutações já foram caracterizadas por *Anand et al.* e se mostraram capazes de reproduzir diferentes fenótipos já observados em outros modelos transgênicos presentes na literatura. HeLa e MEFs YME1L$^{-/-}$ não são capazes de constitutivamente clivar OPA-1, são mais susceptíveis à apoptose, apresentam uma rede mitocondrial constitutivamente fragmentada fruto da maior quantidade de bandas “c” e “e” de s-OPA (geradas pela ação de OMA-1, que se encontra mais ativa nessas células, o que sugere algum tipo de regulação entre essas proteases) (63). Além disso, a estrutura das cristas mitocondriais dessas células é completamente desfigurada, o que demonstra um papel importante dessa i-AAA protease na fisiologia basal da organela. A deleção de OMA-1, por outro lado, não provoca a fragmentação constitutiva mitocondrial ou a desorganização estrutural das cristas, e surpreendentemente, é capaz de conferir resistência às células contra o dano induzido por H_2O_2, reduzindo a morte apoptótica para níveis menores que os observados em *wt*. As células duplo *knockout* apresentam atividade de fusão preservada, sem fragmentação basal, e o fenômeno da defesa contra apoptose preservado.

Desta forma, iniciamos o nosso estudo destas células caracterizando a resistência de cada uma delas frente ao stress de H/R sem nenhuma intervenção, como ilustrado na figura 16A.

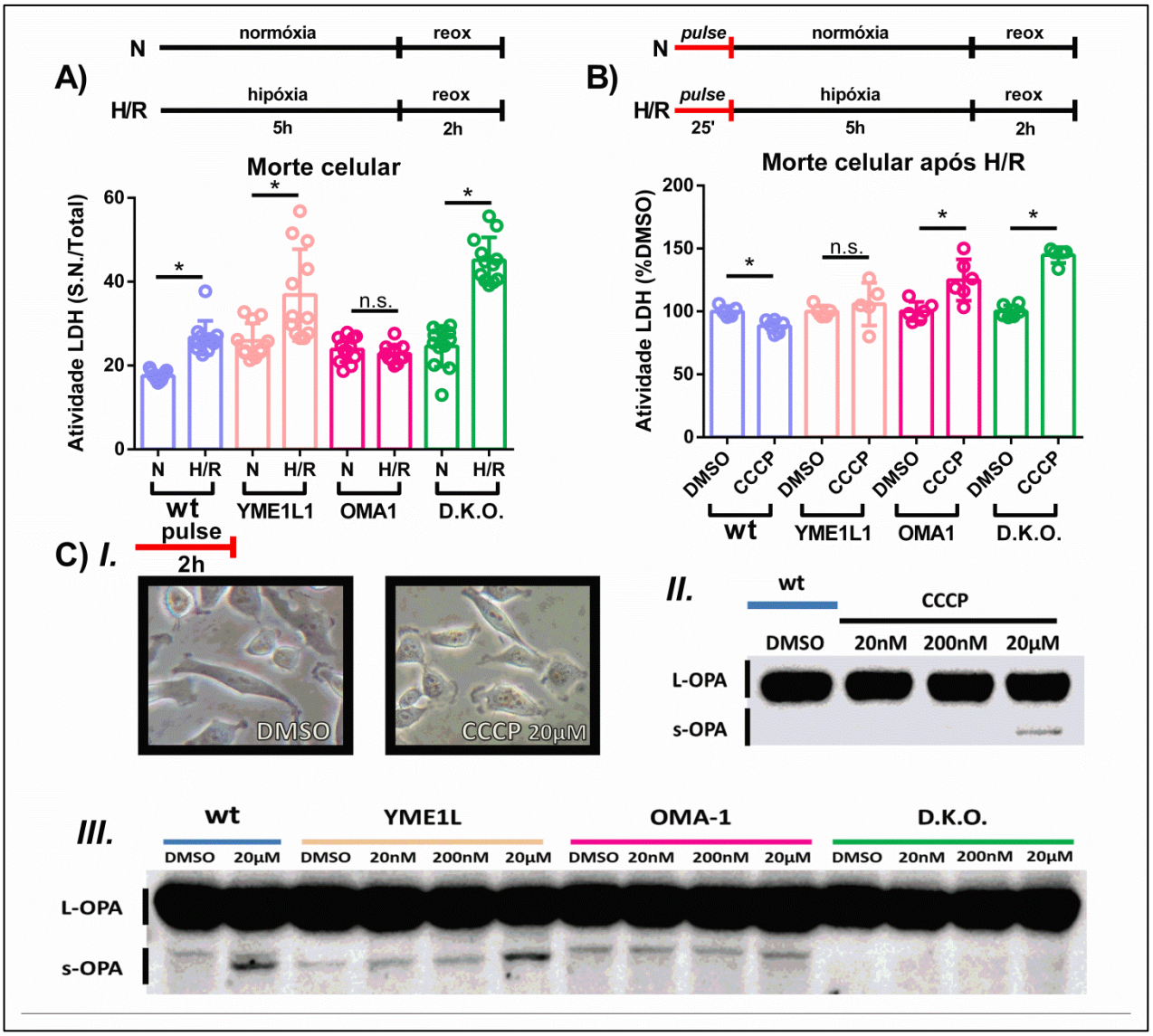

Figura 16: Contribuição de diferentes genótipos de HeLa no stress de H/R e clivagem de OPA-1. A) Morte celular necrótica observada em nas células expostas à H/R conforme esquema ilustrativo.*p<0,05 em teste t vs normóxia B) Morte celular frente ao insulto de H/R com ou sem pulse de 25 minutos com 200nM CCCP. *p<0,05 em teste t vs DMSO. C)I. Microscopia de campo claro (200X) de HeLa wt expostas à 2 horas de pulse com veículo (DMSO) ou CCCP 20µM. C)II. Padrão de bandas de OPA-1 após pulse de 25 minutos com diferentes doses do desacoplador. C)III. Padrão de bandas de OPA-1 nos diferentes genótipos estudados nas diferentes doses de desacoplador testadas.

Os resultados expressos na figura 16A são uma contribuição valiosa, uma vez que não há nenhum trabalho na literatura investigando o comportamento de cada um dos *knockouts* frente ao estresse de Hipóxia/Reoxigenação até então, e por este motivo serão detalhados a seguir,

embora contribuam moderadamente para o entendimento dos mecanismos envolvidos na conferencia de CIP.

Nas condições padronizadas em outros experimentos (omitidos neste documento), o protocolo de H/R *in-vitro* foi capaz de gerar uma morte celular 50% maior que o controle Krebs-Henseleit normóxia em células HeLa wt, o que é comparável com o encontrado nas células H9c2. Chama a atenção que as células K.O. (todos os três genótipos) apresentam uma morte basal neste controle mais elevadas do que as wt, o que indica uma possível diminuição de viabilidade conferida pela manipulação genética. Quando estressadas, YME1L$^{-/-}$ apresentam o mesmo aumento de 50% em relação ao controle normóxico, o que indica que este genótipo não torna as células mais susceptíveis ao procedimento.

O resultado mais interessante obtido foi o observado nas células que não expressam a protease induzida por stress OMA-1. O procedimento de H/R não surtiu nenhum efeito nestas células que já foram descritas como resistentes à apoptose induzida por H_2O_2, e agora se demonstram resistentes ao dano isquêmico, o que torna promissora a aplicação de um possível inibidor de OMA-1 em determinadas situações patológicas, podendo ser transformado futuramente em um fármaco. A biologia desta protease, além de já conhecida em seu papel na clivagem de OPA-1, está sendo associada à bioenergética da célula, e já foi demonstrado que animais K.O. para ela sofrem de obesidade induzida por dieta e com problemas na termogênese (67). Contudo, trabalhos caracterizando animais K.O. constitutivos perdem o poder de estudar a inibição da atividade de uma proteína em situações pontuais, gerando dados com baixo poder de aplicação no cenário que estamos estudando.

Quanto à célula DKO, é notável a maior susceptibilidade frente ao dano gerado por Hipóxia/Reoxigenação, que atingem um aumento da morte celular de até 83% quando desafiadas, vencendo portanto, os valores atingidos por todos os demais fenótipos expostos à estas condições. Estas células não apresentam nenhuma isoforma curta de OPA-1, o que pode ser um dos motivos pelos quais se verifica este fenômeno.

Feita esta divagação acerca do comportamento de cada genótipo frente ao dano de H/R, volto a discutir como cada um destes genótipos se comporta quando anteriormente à hipóxia, se promove a exposição à dose de 200nM do desacoplador CCCP com uma duração de 25 minutos. Este comportamento foi analisado tanto no âmbito da morte celular necrótica induzida por H/R (figura 16B), quanto na capacidade de induzir a clivagem da proteína OPA-1 logo após o pulse (figura 16C*II*. e 16C*III*.)

Nas condições apresentadas acima, as células wt foram capazes de se proteger contra o dano quando pré-tratadas com CCCP, atingindo uma morte celular 12% menor do que o controle DMSO. Este resultado dá maior robustez à CIP, uma vez que pode ser verificada em diferentes tipos celulares, e desta vez em células de humanos. Contudo, quando observamos a capacidade de clivagem de OPA-1 com as diferentes doses de desacoplador, apenas a dose de 20μM se mostra capaz de induzir a clivagem via OMA-1 (e esta dose não fora eficaz em proteger as células wt em outro experimento omitido neste documento). Assim, visto que a proteção observada nas células wt pode ser dissociada da capacidade de clivagem de OPA-1, somos obrigados a rejeitar nossa hipótese inicial, de que tal clivagem seria o mecanismo celular mediador da proteção. Contudo, os resultados obtidos com os demais genótipos celulares empregados neste estudo, apontam sim para um envolvimento destas proteínas na conferencia de CIP. Isto é possível, porque estas proteases não tem apenas OPA-1 como substrato, mas, pelo contrario, possuem um bom número de alvos já conhecidos, e ainda, a possibilidade de atuar sobre outras proteínas ainda não identificadas.

Além disso, estas mesmas células wt não foram capazes de apresentar vacúolos induzidos pelo pulse com 20μM CCCP (figura 16C*I*.) como fora observado anteriormente em H9c2 (figura 11C), o que indica que estes vacúolos gerados na condição de stress não estão necessariamente ligados ao processo de proteção.

Células YME1L$^{-/-}$ se demonstraram incapazes de se proteger com o pulse com CCCP, o que indica que de alguma forma esta protease seja necessária para a CIP. A banda curta de OPA-1 que nas células wt estão

presentes apenas após a adição de CCCP 20μM, está constitutivamente presente nestas células K.O. para YME1L, evidenciando que de alguma forma esta protease tem o poder de inibir a ação de OMA-1 quando ambas estão presentes em situações basais. De fato, este fenômeno é conhecido (68), mas traz importantes confirmações de que a banda de s-OPA observada nestas células é de fato oriunda da ação de OMA1, uma vez que se apresenta mais expressa após o tratamento com a concentração de 20μM CCCP (que se mostrou capaz de ativar OMA1 nas células wt). Isso é importante pois o anticorpo que estamos usando não está gerando exatamente o mesmo padrão de bandas observado na literatura para OPA-1.

No caso das células $OMA1^{-/-}$ é notável a maior morte celular observada após H/R quando estas células são tratadas com o desacoplador. Este fato também sugere que a protease possa estar envolvida na geração de CIP, embora, como fora demonstrado na figura 16A, este genótipo se mostrou imune à H/R independentemente de tratamento, o que indica que talvez fosse mais interessante a investigação proposta em um modelo um pouco mais agressivo, já que seria impossível, nessas condições, promover uma proteção ainda maior que a inata destas células frente ao dano. Quanto ao padrão de clivagem de OPA-1, a ausência de OMA1 provoca o aparecimento de apenas uma banda de s-OPA independentemente da dose de desacoplador utilizada. O fato desta banda não ter intensidade aumentada com a dose maior, indica que ela é oriunda da atividade de YME1L, o que ajuda a caracterizar ainda mais o padrão observado nos *Western blots* com este anticorpo.

O knockout duplo destas proteases agrava ainda mais o dano observado nas células $OMA^{-/-}$ após o tratamento com CCCP, o que valida os resultados obtidos nas células K.O. para cada uma das proteases individualmente, sacramentando o papel de ambas na conferencia de proteção. Além disso, a ausência de ambas as proteases provoca o desaparecimento de ambas as bandas de s-OPA tanto em condições basais, quanto frente ao *pulse* com CCCP.

4 CONCLUSÃO

Trabalhando com a linhagem imortalizada de mioblastos cardíacos de rato H9c2, mantivemos como objetivo a todo o instante procurar identificar novas estratégias para a diminuição do dano celular oriundo da hipóxia/reoxigenação, componente envolvido com uma série de doenças (como o infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica, isquemias renais, intestinais, entre outras) que acometem diversos órgãos humanos (cérebro, coração, musculo, olhos, rins, etc.). Este tipo de investigação, portanto, justifica-se na área biomédica devido à demanda de novas terapias para uma série de doenças graves ou não, que apresentam um mesmo mecanismo fisiopatológico.

Ao longo de pouco mais de dois anos, fomos capazes de descobrir nestes mioblastos uma maneira não convencional de diminuir a morte celular induzida por H/R, mediada pelo tratamento com um desacoplador (classe de moléculas que há muitas décadas é caracterizada pelos diversos efeitos deletérios em diferentes modelos biológicos). Ao tentar descobrir os mecanismos que regem a emergência desta proteção adentramos em três possíveis candidatos: a recém-descoberta via UPRam, o sistema lisossomal/autofágico, e por fim a clivagem de OPA-1 frente ao estresse.

Ao longo desta jornada nos deparamos com uma série de resultados negativos. A via UPRam não mostrou-se conservada em mamíferos, não só pelo meu trabalho, mas também pela ultima autora do trabalho pioneiro, assim não podendo ser a explicação do porque as células se encontram protegidas após o tratamento com CCCP. O bloqueio da degradação lisossomal inesperadamente demonstrou-se benéfico frente à H/R, sendo incapaz de bloquear a proteção conferida pelo CCCP. Pelo contrário, os efeitos foram aditivos no tratamento concomitante, demonstrando portanto que o aumento do fluxo autofágico mediado por CCCP (verificado neste modelo experimental) não fora o mecanismo para a conferência de CIP. Por fim, apesar das muitas evidências apontando para que a clivagem de OPA-1 frente ao tratamento com CCCP fosse o almejado mecanismo, experimentos com HeLa demonstraram

que é possível gerar a proteção ao dano independentemente da clivagem de OPA-1, negando portanto mais esta hipótese.

Desta forma, até o presente momento, não sabemos por que o tratamento com CCCP gera um efeito benéfico, mas conseguimos vastas evidências de que ele de fato o gera. Devido aos diversos efeitos deletérios que esta molécula é capaz de causar em determinadas situações, e ao momento que o tratamento deve ser feito (anterior ao dano), a ideia de aplicar esta intervenção na clínica está completamente descartada, mas de qualquer forma ainda se torna interessante desvendar o mecanismo de funcionamento, uma vez que, ai sim, seria possível o desenvolvimento de uma estratégia translacional.

Contudo, alguns resultados obtidos trazem boas perspectivas futuras para as estratégias de diminuição de danos em doenças isquêmicas. O principal deles é a maneira indiferente com que as células HeLa OMA1$^{-/-}$ se comportaram no procedimento de H/R que se mostrara capaz de aumentar a morte celular de HeLa wt em até 50%. É possível que um inibidor da atividade proteolítica de OMA1 possa mimetizar este comportamento, sendo portanto uma molécula promissora para a geração de novas terapias. Vale ressaltar que esta protease está sendo amplamente estudada nos últimos anos, mas nenhum inibidor ainda fora descoberto.

5 REFERÊNCIAS

1. Hellermann JP, Jacobsen SJ, Gersh BJ, Rodeheffer RJ, Reeder GS, Roger VL. Heart failure after myocardial infarction: a review. Am J Med. 2002;113(4):324-30.
2. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2017;135(10):e146-e603.
3. Nowbar AN, Howard JP, Finegold JA, Asaria P, Francis DP. 2014 global geographic analysis of mortality from ischaemic heart disease by country, age and income: statistics from World Health Organisation and United Nations. Int J Cardiol. 2014;174(2):293-8.
4. Hartzler GO, Rutherford BD, McConahay DR, Johnson WL, McCallister BD, Gura GM, et al. Percutaneous transluminal coronary angioplasty with and without thrombolytic therapy for treatment of acute myocardial infarction. Am Heart J. 1983;106(5 Pt 1):965-73.
5. Spoon DB, Psaltis PJ, Singh M, Holmes DR, Gersh BJ, Rihal CS, et al. Trends in cause of death after percutaneous coronary intervention. Circulation. 2014;129(12):1286-94.
6. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. Nat Med. 2011;17(11):1391-401.
7. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. Physiol Rev. 2005;85(3):1093-129.
8. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. J Clin Invest. 2013;123(1):92-100.
9. Piper HM, Meuter K, Schäfer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. Ann Thorac Surg. 2003;75(2):S644-8.
10. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. Int Rev Cell Mol Biol. 2012;298:229-317.
11. Chen M, Won DJ, Krajewski S, Gottlieb RA. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. J Biol Chem. 2002;277(32):29181-6.
12. Ganote CE. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. J Mol Cell Cardiol. 1983;15(2):67-73.
13. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. Pharmacol Ther. 2012;133(2):230-55.
14. Sciarretta S, Hariharan N, Monden Y, Zablocki D, Sadoshima J. Is autophagy in response to ischemia and reperfusion protective or detrimental for the heart? Pediatr Cardiol. 2011;32(3):275-81.
15. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. N Engl J Med. 2009;361(16):1570-83.
16. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2001;33(6):1065-89.
17. Inserte J, Barba I, Hernando V, Garcia-Dorado D. Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. Cardiovasc Res. 2009;81(1):116-22.
18. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. 1986;74(5):1124-36.
19. Veighey K, Macallister RJ. Clinical applications of remote ischemic preconditioning. Cardiol Res Pract. 2012;2012:620681.

20. Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. Science. 2008;321(5895):1493-5.
21. Iwamoto H, Miura T, Okamura T, Shirakawa K, Iwatate M, Kawamura S, et al. Calpain inhibitor-1 reduces infarct size and DNA fragmentation of myocardium in ischemic/reperfused rat heart. J Cardiovasc Pharmacol. 1999;33(4):580-6.
22. Garcia-Dorado D, Théroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. Circulation. 1992;85(3):1160-74.
23. Heazlewood JL, Millar AH, Day DA, Whelan J. What makes a mitochondrion? Genome Biol. 2003;4(6):218.
24. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. Cell. 2009;138(4):628-44.
25. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol. 2000;300(4):1005-16.
26. Gavel Y, Nilsson L, von Heijne G. Mitochondrial targeting sequences. Why 'non-amphiphilic' peptides may still be amphiphilic. FEBS Lett. 1988;235(1-2):173-7.
27. Giglione C, Boularot A, Meinnel T. Protein N-terminal methionine excision. Cell Mol Life Sci. 2004;61(12):1455-74.
28. Fieulaine S, Juillan-Binard C, Serero A, Dardel F, Giglione C, Meinnel T, et al. The crystal structure of mitochondrial (Type 1A) peptide deformylase provides clear guidelines for the design of inhibitors specific for the bacterial forms. J Biol Chem. 2005;280(51):42315-24.
29. Wrobel L, Topf U, Bragoszewski P, Wiese S, Sztolsztener ME, Oeljeklaus S, et al. Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. Nature. 2015;524(7566):485-8.
30. Wasilewski M, Chojnacka K, Chacinska A. Protein trafficking at the crossroads to mitochondria. Biochim Biophys Acta. 2017;1864(1):125-37.
31. Mordas A, Tokatlidis K. The MIA pathway: a key regulator of mitochondrial oxidative protein folding and biogenesis. Acc Chem Res. 2015;48(8):2191-9.
32. Wang X, Chen XJ. A cytosolic network suppressing mitochondria-mediated proteostatic stress and cell death. Nature. 2015;524(7566):481-4.
33. Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. Exp Cell Res. 1976;98(2):367-81.
34. Branco AF, Pereira SP, Gonzalez S, Gusev O, Rizvanov AA, Oliveira PJ. Gene Expression Profiling of H9c2 Myoblast Differentiation towards a Cardiac-Like Phenotype. PLoS One. 2015;10(6):e0129303.
35. Dabir DV, Hasson SA, Setoguchi K, Johnson ME, Wongkongkathep P, Douglas CJ, et al. A small molecule inhibitor of redox-regulated protein translocation into mitochondria. Dev Cell. 2013;25(1):81-92.
36. Kwon KY, Viollet B, Yoo OJ. CCCP induces autophagy in an AMPK-independent manner. Biochem Biophys Res Commun. 2011;416(3-4):343-8.
37. NATHANS D. PUROMYCIN INHIBITION OF PROTEIN SYNTHESIS: INCORPORATION OF PUROMYCIN INTO PEPTIDE CHAINS. Proc Natl Acad Sci U S A. 1964;51:585-92.
38. Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. Nat Methods. 2009;6(4):275-7.
39. Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, et al. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. Hum Genet. 2001;109(6):584-91.
40. Doonan F, Cotter TG. Morphological assessment of apoptosis. Methods. 2008;44(3):200-4.
41. Kaiser J. Hormesis. Sipping from a poisoned chalice. Science. 2003;302(5644):376-9.

42. Axelrod D, Burns K, Davis D, von Larebeke N. "Hormesis"--an inappropriate extrapolation from the specific to the universal. Int J Occup Environ Health. 2004;10(3):335-9.
43. Minners J, van den Bos EJ, Yellon DM, Schwalb H, Opie LH, Sack MN. Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection. Cardiovasc Res. 2000;47(1):68-73.
44. Hu G, Wang K, Groenendyk J, Barakat K, Mizianty MJ, Ruan J, et al. Human structural proteome-wide characterization of Cyclosporine A targets. Bioinformatics. 2014;30(24):3561-6.
45. Brennan JP, Berry RG, Baghai M, Duchen MR, Shattock MJ. FCCP is cardioprotective at concentrations that cause mitochondrial oxidation without detectable depolarisation. Cardiovasc Res. 2006;72(2):322-30.
46. Brennan JP, Southworth R, Medina RA, Davidson SM, Duchen MR, Shattock MJ. Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation. Cardiovasc Res. 2006;72(2):313-21.
47. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. J Cell Biol. 2008;183(5):795-803.
48. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. Science. 2011;334(6054):358-62.
49. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy. 2016;12(1):1-222.
50. Xie M, Morales CR, Lavandero S, Hill JA. Tuning flux: autophagy as a target of heart disease therapy. Curr Opin Cardiol. 2011;26(3):216-22.
51. Ma S, Wang Y, Chen Y, Cao F. The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury. Biochim Biophys Acta. 2015;1852(2):271-6.
52. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. Circ Res. 2007;100(6):914-22.
53. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. J Biol Chem. 2006;281(40):29776-87.
54. Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, Carroll CJ, Soond S, Scarabelli TM, et al. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol. 2006;40(6):846-52.
55. Joo JH, Dorsey FC, Joshi A, Hennessy-Walters KM, Rose KL, McCastlain K, et al. Hsp90-Cdc37 chaperone complex regulates Ulk1- and Atg13-mediated mitophagy. Mol Cell. 2011;43(4):572-85.
56. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. EMBO J. 2008;27(2):433-46.
57. Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, van der Bliek AM. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. J Cell Biol. 2009;187(7):959-66.
58. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingerman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. Dev Cell. 2008;14(2):193-204.
59. Padman BS, Bach M, Lucarelli G, Prescott M, Ramm G. The protonophore CCCP interferes with lysosomal degradation of autophagic cargo in yeast and mammalian cells. Autophagy. 2013;9(11):1862-75.
60. Wai T, García-Prieto J, Baker MJ, Merkwirth C, Benit P, Rustin P, et al. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. Science. 2015;350(6265):aad0116.

61. Sun Y, Xue W, Song Z, Huang K, Zheng L. Restoration of Opa1-long isoform inhibits retinal injury-induced neurodegeneration. J Mol Med (Berl). 2016;94(3):335-46.
62. Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. EMBO J. 2006;25(13):2966-77.
63. Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, et al. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. J Cell Biol. 2014;204(6):919-29.
64. Elachouri G, Vidoni S, Zanna C, Pattyn A, Boukhaddaoui H, Gaget K, et al. OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. Genome Res. 2011;21(1):12-20.
65. Griparic L, Kanazawa T, van der Bliek AM. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. J Cell Biol. 2007;178(5):757-64.
66. Barupala DP, Dzul SP, Riggs-Gelasco PJ, Stemmler TL. Synthesis, delivery and regulation of eukaryotic heme and Fe-S cluster cofactors. Arch Biochem Biophys. 2016;592:60-75.
67. Quirós PM, Ramsay AJ, Sala D, Fernández-Vizarra E, Rodríguez F, Peinado JR, et al. Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. EMBO J. 2012;31(9):2117-33.
68. Rainbolt TK, Lebeau J, Puchades C, Wiseman RL. Reciprocal Degradation of YME1L and OMA1 Adapts Mitochondrial Proteolytic Activity during Stress. Cell Rep. 2016;14(9):2041-9.