

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

## 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<sup>-/-</sup> 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.

## 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 última 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](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 (último 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/Reperusão 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 sequência 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

citossólicas cuja atividade é dependente de cálcio), que clivam componentes contráteis 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 contração 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).

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

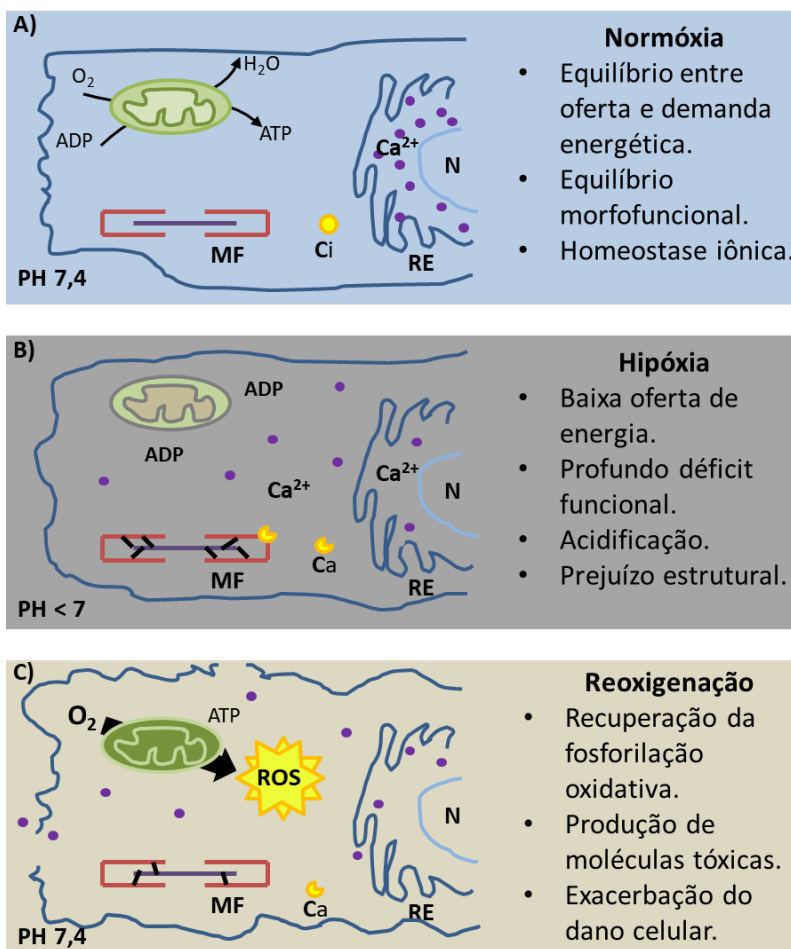


Figura 1: esquema ilustrativo da fisiologia celular do cardiomiócito em condições normais (A), sob condições hipóxicas (B) ou no momento agudo da reperfusão (C). MF miofibrilas, N núcleo, Ci Calpaína inativa, Ca calpaína ativa, RE retículo endoplasmático, círculos roxos simbolizam íons  $Ca^{2+}$ .

miofibrilas (7). O déficit energético compromete o funcionamento da proteína SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase*), que realiza a recaptação dos íons Ca<sup>2+</sup> 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), porém, 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 tóxicas), 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  $\text{Ca}^{2+}$ , o músculo 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,  $\alpha$ -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 tóxicas 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 objetivo principal o desenvolvimento de uma nova estratégia para limitar o dano de isquemia/reperfusão no miocárdio, com o diferencial de não focar em um único aspecto da gênese do dano, buscando então maximizar sua robustez frente a esta injúria 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 evidências 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 sequência 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  $\alpha$ -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 sequência 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 embryonic 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.

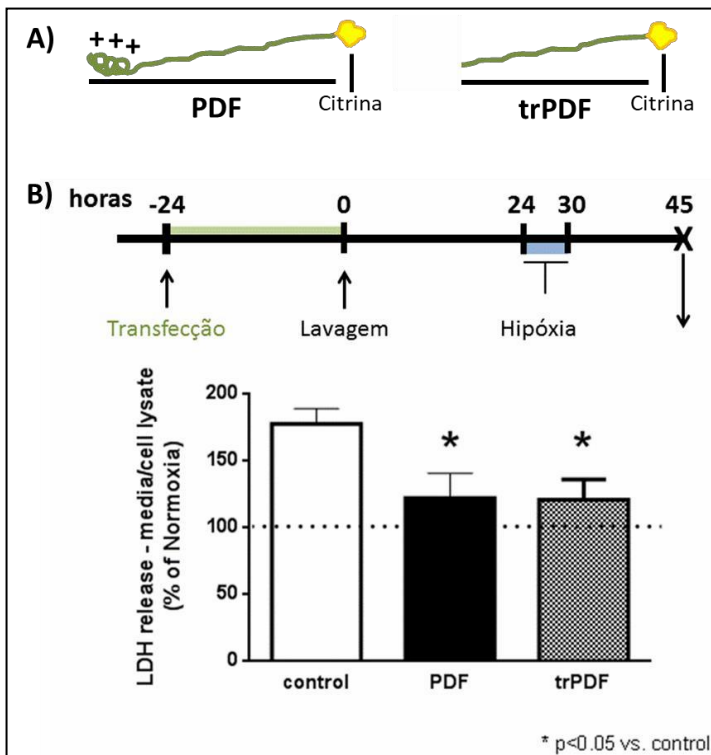


Figura 2. A) Ilustração do produto de cada um dos plasmídeos empregados no estudo. B) cima: linha do tempo do protocolo experimental; baixo: atividade da enzima lactato desidrogenase após protocolo descrito na linha temporal. \*p<0,05 em teste t vs control.

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 sequência primária (e não na porção N-terminal, como é a MTS). Este motivo é composto de duas unidades de uma sequência contendo duas cisteínas separadas por 3 ou 9 resíduos de aminoácidos quaisquer (daí o nome twin (CX<sub>3</sub>C)<sub>2</sub> e twin (CX<sub>9</sub>C)<sub>2</sub>), 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 número 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 Erv1, 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 transcriptômica, identificaram uma série de alterações na abundância 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 último, 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 UPR<sub>am</sub> 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*

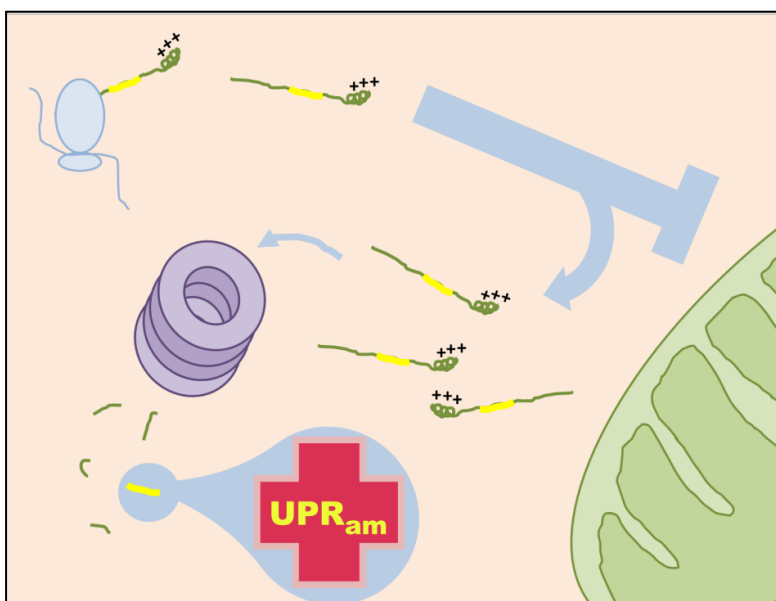


Figura 3: ilustração esquemática da hipótese do estudo. Peptídeos liberados pela degradação proteassomal de proteínas mitocondriais seriam capazes de ativar a UPR<sub>am</sub> em células de mamíferos.

*cerevisiae* e ter protegido essas células ao estresse de choque térmico, a UPR<sub>am</sub> 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.

Além disso, dado o papel indispensável do proteassoma na conferência de tal resistência, hipotetizamos ainda que a molécula natural ativadora da UPR<sub>am</sub> 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 UPR<sub>am</sub>. 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 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 última 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, aí 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<sup>-/-</sup> 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.

### 3 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, Sztolszterer 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 Uik1- 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.