

Alicia Juliana Kowaltowski

**Permeabilização da Membrana Mitocondrial
Interna Induzida por Ca^{2+} em Condições de
Estresse Oxidativo**

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

Orientador: Anibal E. Vercesi
Área de concentração: Patologia Clínica
Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP, Brasil – 1999

FICHA CATALOGRÁFICA

Kowaltowski, Alicia Juliana

Permeabilização da Membrana Mitocondrial Interna Induzida por Ca^{2+} em Condições de Estresse Oxidativo / Alicia Juliana Kowaltowski -- Campinas, 1999. 115 p.; Ilustr.

Tese: (Doutorando -- Ciências Médicas -- Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Campinas

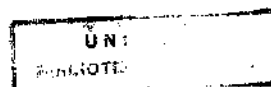
1. Mitocôndria; 2. Estresse Oxidativo
3. Cálcio; 4. Bcl-2

Alicia Juliana Kowaltowski

**Permeabilização da Membrana Mitocondrial
Interna Induzida por Ca^{2+} em Condições de
Estresse Oxidativo**

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

Orientador: Anibal E. Vercesi
Área de concentração: Patologia Clínica
Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP, Brasil – 1999



Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi

Membros:

1. Maria H. J. Lobo

2. Galvão

3. José Antônio Lobo

4. B. B. B. B.

5. Aníbal Vercesi

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

Data: 09. 8. 99

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética do Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob a orientação do Professor Anibal Eugênio Vercesi e no Department of Anesthesiology, University of Maryland at Baltimore School of Medicine, sob a orientação do Professor Gary Fiskum, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP) e Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT).

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Anibal E. Vercesi, pela amizade, incentivo, orientação e, principalmente, por ter me dado a liberdade para o desenvolvimento da minha independência.

Ao Professor Gary Fiskum, por ter me acolhido prontamente em seu laboratório, e pelas oportunidades de aprendizado que me incentivou a seguir.

Ao Dr. Roger F. Castilho, por ter me ensinado o passo a passo de se fazer ciência durante a minha iniciação científica, e pela leitura crítica desta Tese.

A Etelvino J.H. Bechara e Luis E.S. Netto, pelas imprescindíveis colaborações nos trabalhos apresentados nessa tese.

À minha família, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

Ao André R. Meinicke, Mercedes T. Grijalba, Joaquim A.F. Vicente, Alexandre D.T. Costa, Evandro S. Naia da Silva, Bruna M.A.R. Teixeira, Soraya S. Smaili, James T. Russell e Iris Torriani pelos trabalhos conjuntos.

Ao auxílio dos técnicos Regina C. Rossetto, Luis H.G. Ribeiro, Mateus P. Vercesi, Caroline S. Fukushima, Cláudia O. Silva e Steven J. Russell.

À Marcia M. Fagian e Carmen S. dos Santos, pela paciência e ajuda com problemas burocráticos.

Aos colegas de laboratório Alex, Andreia, Chandra, Celene, Endrigo, Fabiane, Fernanda, Fernando (Felix), Graziela, Guta, Iseli, Jussiani, Laura, Ricardo, Renata, Rosana e Zara pelos momentos de descontração.

Aos Professores Mário J.A. Saad e José Antonio Gontijo da Pós-Graduação da FCM-UNICAMP.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	6
1.1. Homeostase Intracelular de Ca^{2+}	7
1.2. Cadeia Respiratória Mitocondrial e Sítios de	
Geração de Radicais Superóxido.....	10
1.3. Espécies Reativas de Oxigênio Formadas pela Mitocôndria.....	13
1.4. Condições que Alteram a Geração de EROs Mitocondrial.....	16
1.5. Defesas Antioxidantes.....	18
1.6. Lesões Mitocondriais Causadas por EROs em	
Condições de Estresse Oxidativo.....	20
<i>1.6.1. Oxidação de proteínas de membrana mitocondrial.....</i>	<i>20</i>
<i>1.6.2. Transição de Permeabilidade Mitocondrial.....</i>	<i>20</i>
<i>1.6.3. Peroxidação lipídica da membrana mitocondrial interna.....</i>	<i>23</i>
1.7. Efeitos do Estresse Oxidativo Mitocondrial na Integridade Celular.....	24
2. OBJETIVOS.....	29
3. RESULTADOS.....	31
3.1. - 1º Trabalho.....	31
<i>3.1.1. Introdução ao 1º Trabalho.....</i>	<i>31</i>

3.1.2. <i>Effect of Inorganic Phosphate Concentration on the Nature of Inner Mitochondrial Membrane Alterations Mediated by Ca^{2+} Ions: A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation.</i>	33
3.1.3. <i>Discussão do 1º Trabalho</i>	40
3.2. - 2º Trabalho	43
3.2.1. <i>Introdução ao 2º Trabalho</i>	43
3.2.2. <i>The Thiol-specific Antioxidant Enzyme Prevents Mitochondrial Permeability Transition: Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism.</i>	45
3.2.3. <i>Discussão do 2º Trabalho</i>	50
3.3. - 3º Trabalho	53
3.3.1. <i>Introdução ao 3º Trabalho</i>	53
3.3.2. <i>Bcl-2 Prevents Mitochondrial Permeability Transition and Cytochrome c Release Due to Increased Mitochondrial Reducing Power</i>	55
3.3.3. <i>Discussão do 3º Trabalho</i>	82
4. DISCUSSÃO GERAL	84
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
6. APÊNDICE – Curriculum Vitae	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	- Adenosina-5'-trifosfato
ADP	- Adenosina-5'-difosfato
Bcl-2	- B-cell lymphoma protein 2
DTNB	- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EGTA	- Ácido etileno glycol-bis (β -aminoetil éter) N,N,N',N' tetra acético
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
GSH	- Glutathiona reduzida
GSSG	- Glutathiona oxidada
GTP	- Guanosina-5'-trifosfato
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
HO [•]	- Radical hidroxil
HO ₂ [•]	- Radical perhidroxil
Mn-SOD	- Mn-superóxido dismutase
MPT	- Mitochondrial permeability transition
NAD(P) ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato), forma oxidada
NAD(P)H	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato), forma reduzida
NAD ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NO [•]	- Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	- Radical superóxido
ONOO ⁻	- Peroxinitrito
P _i	- Fosfato inorgânico
TPM	- Transição de permeabilidade mitocondrial
UQ	- Forma oxidada da coenzima Q
UQH [•]	- Forma semiquinona da coenzima Q
UQH ₂	- Forma reduzida da coenzima Q

RESUMO

Permeabilização da Membrana Mitocondrial Interna Induzida por Ca^{2+} em Condições de Estresse Oxidativo

A exposição de mitocôndrias a quantidades excessivas de Ca^{2+} pode levar a uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna, conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM). Estudos indicam que a TPM pode desencadear tanto a morte celular programada (apoptose) quanto acidental (necrose), e é inibida pela proteína antiapoptótica Bcl-2. Além disso, a apoptose e necrose envolvem processos de estresse oxidativo celular.

Neste trabalho, integramos essas duas linhas de pesquisa, demonstrando que a permeabilização mitocondrial associada à TPM ocorre secundariamente à oxidação de proteínas de membrana, causada por espécies reativas de oxigênio geradas pela organela na presença de Ca^{2+} . Nossos experimentos comprovam que a TPM pode ser inibida por catalase e peroxidases tiólicas como a tioredoxina peroxidase e ebselen. Verificamos também que células hiperexpressam Bcl-2 são resistentes à TPM induzida por estresse oxidativo mitocondrial, mas não pelo óxido de fenil arsina, que se liga diretamente a grupamentos tiólicos de proteínas. Além disso, mitocôndrias que hiperexpressam Bcl-2 tem maior resistência à oxidação de NAD(P)H.

Deste modo, demonstramos que a permeabilização mitocondrial associada à TPM é causada por espécies reativas de oxigênio. O Bcl-2, que aumenta o poder redutor celular, previne a TPM por aumentar a capacidade redutora da mitocôndria.

ABSTRACT

"Ca²⁺-Induced Permeabilization of the Inner Mitochondrial Membrane Under Conditions of Oxidative Stress"

Excessive mitochondrial Ca²⁺ uptake may lead to a non-selective permeabilization of the inner mitochondrial membrane, known as mitochondrial permeability transition (MPT). Recent studies have shown that MPT may act as a trigger for both programmed cell death (apoptosis) or accidental cell death (necrosis), and that this process is inhibited by the anti-apoptotic protein Bcl-2. Other studies have shown that both apoptosis and necrosis involve conditions of cellular oxidative stress.

Here, we propose a model for the occurrence of MPT which integrates these findings. We demonstrate that mitochondrial permeabilization under conditions of MPT is secondary to mitochondrial membrane protein thiol oxidation promoted by Ca²⁺-stimulated, mitochondrially-generated reactive oxygen species. Thus, MPT is inhibited by catalase and the thiol peroxidases thioredoxin peroxidase and ebselen. We also verified that mitochondria from cells overexpressing the Bcl-2 protein are resistant to MPT induced by mitochondrial oxidative stress, but not phenylarsine oxide, which binds directly to mitochondrial membrane protein thiol groups. In addition, Bcl-2 overexpressing cells are resistant to mitochondrial NAD(P)H oxidation.

Taken together, our results show that non-selective mitochondrial permeabilization associated to MPT is caused by mitochondrially-generated reactive oxygen species. Bcl-2, which increases the cellular reductive capacity, prevents MPT by incrementing mitochondrial reducing power.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Há milhões de anos, seres semelhantes às bactérias atuais invadiram células precursoras dos eucariotos, dando origem a uma relação simbiótica (GRAY, BURGER, LANG, 1999). A parceria entre as atuais mitocôndrias e células eucarióticas tem sido, sem dúvida, um grande sucesso, pois trouxe a essas células a vantagem de produzir ATP de maneira altamente conservativa através da fosforilação oxidativa. A energia necessária para a fosforilação oxidativa é obtida do potencial eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna, gerada pela cadeia respiratória mitocondrial. Paradoxalmente, a contínua redução de oxigênio pela cadeia respiratória mitocondrial traz à célula o efeito colateral potencialmente mais sério da síntese mitocondrial de ATP: a constante geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Quando levada em consideração a complexidade do processo de transferência de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, é surpreendente que apenas 1-5% dos elétrons que entram na cadeia respiratória não participam da redução de oxigênio a água. A maioria desses elétrons “perdidos” pela cadeia respiratória são transferidos para o oxigênio em passos intermediários da cadeia respiratória, levando à redução monoeletrônica do oxigênio ao radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (BOVERIS & CHANCE, 1973; TURRENS, 1997; LIU, 1997). Devido ao funcionamento contínuo da cadeia respiratória, essa geração de $O_2^{\cdot -}$ faz da mitocôndria a maior fonte celular de EROs na grande maioria dos tecidos (TURRENS, 1997; LIU, 1997). $O_2^{\cdot -}$ e outras EROs geradas pela mitocôndria têm sido implicados em diversos eventos do ciclo celular, incluindo o envelhecimento e morte celular apoptótica ou necrótica (GREEN & REED, 1998; ZAMZAMI *et al.*, 1996; LEMASTERS *et al.*, 1998; KOWALTOWSKI &

VERCESI, 1999). EROs também têm sido implicadas na patogênese de doenças específicas como a arteriosclerose, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (VISIOLI, 1998; CADET & BRANNOCK, 1998; BOLLI, 1998; KRISTIAN & SIESJO, 1998; JUURLINK & SWEENEY, 1997; MULTHAUP *et al.*, 1997).

Nosso grupo tem se dedicado há vários anos ao estudo dos mecanismos pelos quais as mitocôndrias sofrem lesões após o tratamento com íons Ca^{2+} , obtendo fortes evidências de que EROs mitocondriais estavam envolvidas nesse processo (VALLE *et al.*, 1993; FAGIAN *et al.*, 1990; KOWALTOWSKI, CASTILHO, VERCESI, 1995; CASTILHO *et al.*, 1995a; 1995b; KOWALTOWSKI, *et al.* 1996; GRIJALBA *et al.* 1998; CASTILHO, KOWALTOWSKI, VERCESI, 1996b; VERCESI *et al.*, 1997). Neste trabalho, caracterizamos claramente a participação de EROs nas lesões mitocondriais causadas por Ca^{2+} . Também são estudados os mecanismos pelos quais proteínas inibitórias de morte celular apoptótica, como o Bcl-2 e a tioredoxina peroxidase, inibem a disfunção mitocondrial causada por Ca^{2+} .

1.1 - Homeostase Intracelular de Ca^{2+}

A concentração de Ca^{2+} livre no citosol é de aproximadamente 10^{-7} M, mantida cerca de 10.000 vezes abaixo da concentração extracelular através da atividade de processos de transporte de Ca^{2+} . A membrana plasmática possui um canal para entrada de Ca^{2+} na célula, enquanto o efluxo ativo do íon é promovido por uma Ca^{2+} -ATPase e por sistema de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Assim, devido ao gradiente de concentração entre o meio extracelular e o citosol, pequenos aumentos da permeabilidade da membrana celular ao íon são acompanhados de

um fluxo rápido de Ca^{2+} para o interior da célula (CARAFOLI, 1987). Essa propriedade permite que o Ca^{2+} seja utilizado como carregador de sinais bioquímicos no citosol, um processo essencial para a fisiologia celular.

No compartimento intracelular, a distribuição do Ca^{2+} é heterogênea, e controlada por processos de transporte através das membranas de organelas subcelulares, como o retículo endoplasmático, núcleo e as mitocôndrias. As ATPases de Ca^{2+} localizadas no retículo endo(sarco)plasmático, que translocam 2Ca^{2+} para cada ATP hidrolizado (DE MEIS & VIANNA, 1979), são responsáveis pela regulação fina, porém lenta, da concentração de Ca^{2+} no citosol, devido à sua alta afinidade pelo íon. A liberação de desse Ca^{2+} captado pelo retículo endo(sarco)plasmático é estimulada por inositol trifosfato (IP_3) (BERRIDGE, 1993) e cafeína (SORRENTINO & VOLPE, 1993).

Trocadores iônicos e canais eletroforéticos, como aqueles presentes na mitocôndria, possuem baixa afinidade pelo Ca^{2+} , mas sua alta velocidade de transporte as fazem responsáveis por variações rápidas nas concentrações citosólicas de Ca^{2+} (CARAFOLI, 1987; BASSANI, BASSANI, BERS, 1992). O Ca^{2+} penetra na mitocôndria por um processo eletroforético, através de um uniporter sensível a vermelho de rutênio, em resposta ao potencial elétrico da membrana gerado durante a respiração ou hidrólise de ATP (REED & BYGRAVE, 1974). O efluxo de Ca^{2+} mitocondrial ocorre por um processo distinto da via de entrada, em que um íon Ca^{2+} interno é trocado por dois íons Na^+ ou H^+ (GUNTER & PFEIFFER, 1990). A operação simultânea destes dois transportadores, em mitocôndrias isoladas, estabelece uma condição de equilíbrio em que a concentração de Ca^{2+} é mantida entre 0,5 e 1,0 μM (NICHOLLS, 1978; GUNTER *et al.*, 1994). Assim, no citosol, onde a concentração de Ca^{2+} citosólico é geralmente inferior a 0,1 μM , não se

esperaria que houvesse atividade do sistema mitocondrial de transporte de Ca^{2+} . Entretanto, quando a concentração de Ca^{2+} citosólica aumenta em resposta a algum estímulo externo, como sob a ação de hormônios (vasopressina, angiotensina e catecolaminas) (COBBOLD & RINK, 1987), o sistema mitocondrial de captação de Ca^{2+} se torna operante e a concentração de Ca^{2+} intramitocondrial aumenta. Existem também evidências de que a captação mitocondrial de Ca^{2+} pode estar ativa quando é liberado Ca^{2+} do retículo endo(sarco)plasmático, mesmo sem elevações grandes na concentração de Ca^{2+} citosólica, devido à proximidade entre essas organelas dentro da célula (PINTON *et al.*, 1998; DRUMMOND & TUFT, 1999). Nestas condições, o íon Ca^{2+} estimula três desidrogenases mitocondriais (piruvato, isocitrato e α -cetoglutarato desidrogenase), que catalizam reações regulatórias do ciclo de Krebs, estimulando o metabolismo oxidativo e promovendo um aumento da produção de energia (HANSFORD, 1991).

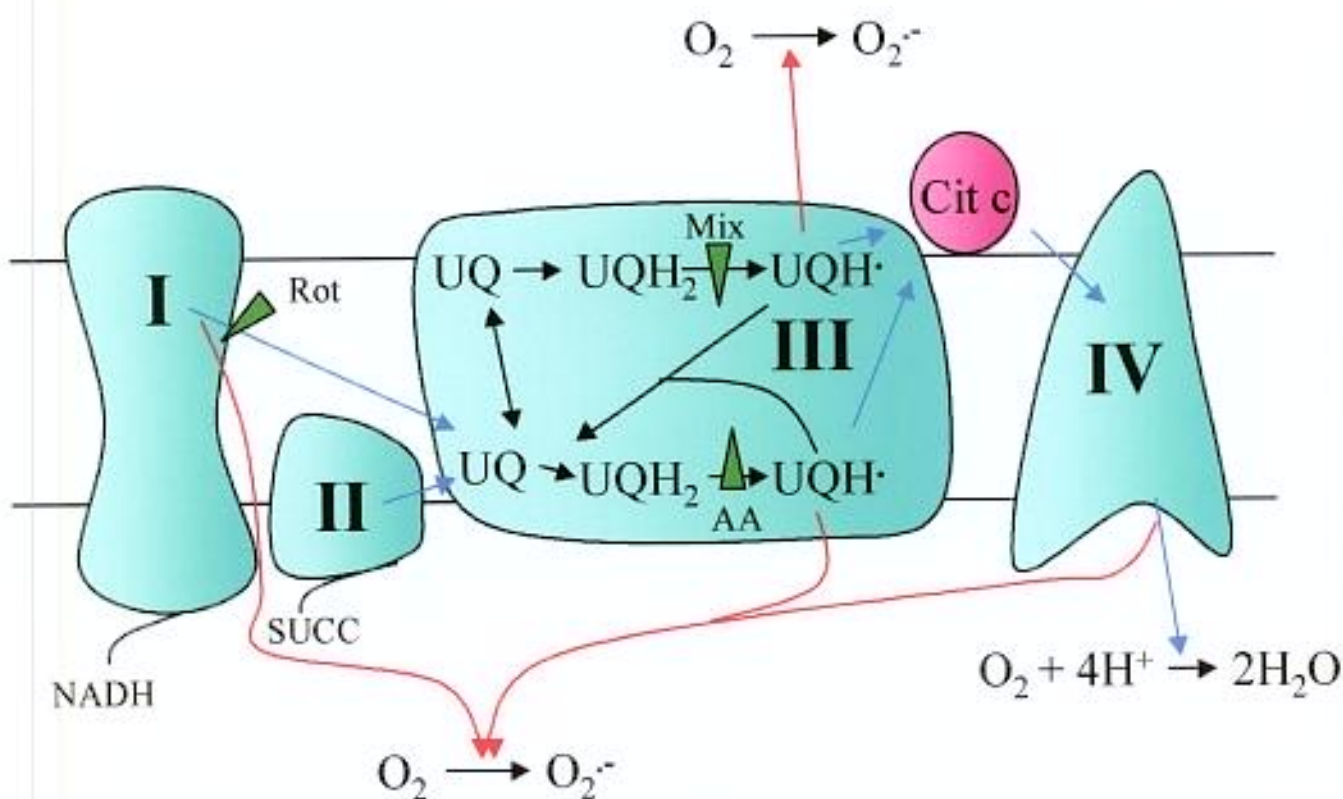
Sabe-se que o Ca^{2+} tem papel determinante no desenvolvimento de uma variedade de processos patológicos e toxicológicos (NICOTERA, BELLOMO, ORRENIUS, 1990; TRUMP & BEREZESKY, 1995). A manutenção de concentrações elevadas de Ca^{2+} citosólico, causada por isquemia, estresse oxidativo ou algumas toxinas, resulta em acúmulo mitocondrial de Ca^{2+} e ativação de enzimas catabólicas Ca^{2+} -dependentes, como fosfolipases, proteases e endonucleases, que levam à morte celular (TRUMP & BEREZESKY, 1995). Essa morte celular está ligada à disfunção mitocondrial promovida pelo acúmulo de grandes quantidades de Ca^{2+} na matriz mitocondrial (veja KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Este acúmulo excessivo de Ca^{2+} resulta na inibição da fosforilação oxidativa (FAGIAN *et al.*, 1986) e permeabilização da membrana

mitocondrial interna, num processo conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial (veja descrição no item 1.6.2.).

1.2. Cadeia Respiratória Mitocondrial e Sítios de Geração de Radicais Superóxido

A cadeia respiratória mitocondrial gera a energia redutora necessária para produzir o potencial elétrico transmembrana e promover a fosforilação oxidativa. Elétrons provenientes de diferentes substratos são colecionados na forma de NADH e transferidos para o átomo de ferro central da NADH dehidrogenase (complexo I – veja esquema I, página 11). O complexo I então transfere elétrons para a forma oxidada da coenzima Q (UQ), levando a sua redução (UQH₂). Elétrons originários do succinato são transferidos para a UQ pelo complexo II, resultando também em sua redução. Em alguns tecidos, a UQ pode ser reduzida também pela glicerol-3-fosfato dehidrogenase, na presença de glicerol-3-fosfato, ou pela ubiquinona oxidoreductase, como consequência da β -oxidação de ácidos graxos (NICHOLLS & FERGUSON, 1982).

A UQH₂ é então deprotonada, resultando na formação do ânion semiquinona (UQH⁻), responsável pela doação de elétrons ao citocromo *c* (cit *c*). Existem dois *pools* distintos de UQH⁻, um localizado na face citoplasmática da membrana mitocondria interna, e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna. As duas formas de UQH⁻ são combinadas quando oxidadas, regenerando UQ e doando seus elétrons para o citocromo *c* (cit *c*). O citocromo *c* então transporta elétrons para a citocromo *c* oxidase (complexo IV), responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio, que resulta na formação de água. Esta passagem de elétrons para o oxigênio se dá em quatro passos consecutivos envolvendo um elétron



Esquema 1 – A Cadeia Respiratória Mitocondrial e Principais Sítios de Vazamento de Elétrons. Os complexos respiratórios mitocondriais (marcados em algarismos romanos) se encontram inseridos na membrana mitocondrial interna, enquanto o citocromo *c* (cit *c*) está intimamente associado a essa membrana. Estes componentes mitocondriais realizam a transferência de elétrons de substratos como NADH ou succinato (SUCC) para o O₂. As setas azuis representam transferências eletrônicas. As setas vermelhas representam os sítios onde é possível ocorrer vazamento de elétrons com redução monoelétrica do O₂. Os triângulos verdes representam os sítios respiratórios inibidos por rotenona (rot), antimicina A (AA) e mixotiazol (mix).

(NICHOLLS & FERGUSON, 1982; TURRENS, 1997).

Foi demonstrado anteriormente que diferentes componentes da cadeia respiratória podem converter O_2 a $O_2^{\cdot -}$ quando reduzidos. Na cadeia respiratória plenamente funcional, isso ocorre com aproximadamente 1-2% do oxigênio consumido (BOVERIS & CHANCE, 1973). O $O_2^{\cdot -}$ originado pela cadeia respiratória pode ser gerado pela NADH dehidrogenase (BOVERIS & CHANCE, 1973; TURRENS & BOVERIS, 1980) ou pela coenzima Q (CADENAS *et al.*, 1977; TURRENS, ALEXANDRE, LEHNINGER, 1985; BOVERIS & CHANCE, 1973) (veja esquema I). Apesar da citocromo *c* oxidase ser o local onde é normalmente realizada a transferência de elétrons para o oxigênio, e desse processo ser realizado em quatro passos de um elétron cada, a liberação de $O_2^{\cdot -}$ pela citocromo *c* oxidase é surpreendente baixa (TURRENS, 1997). Isso se deve à capacidade da citocromo *c* oxidase de se ligar fortemente aos intermediários de oxigênio parcialmente reduzidos, impedindo seu desligamento antes da redução completa. A geração de $O_2^{\cdot -}$ ao nível do átomo central de ferro da NADH dehidrogenase é maior, e pode ser estimulada pela presença de substratos respiratórios que geram NADH, como o malato, glutamato e piruvato. A presença de rotenona, um inibidor da transferência de elétrons entre o complexo I e a UQ, também estimula sensivelmente a geração de $O_2^{\cdot -}$ pela NADH dehidrogenase (TURRENS, 1980; 1997) (ver esquema I).

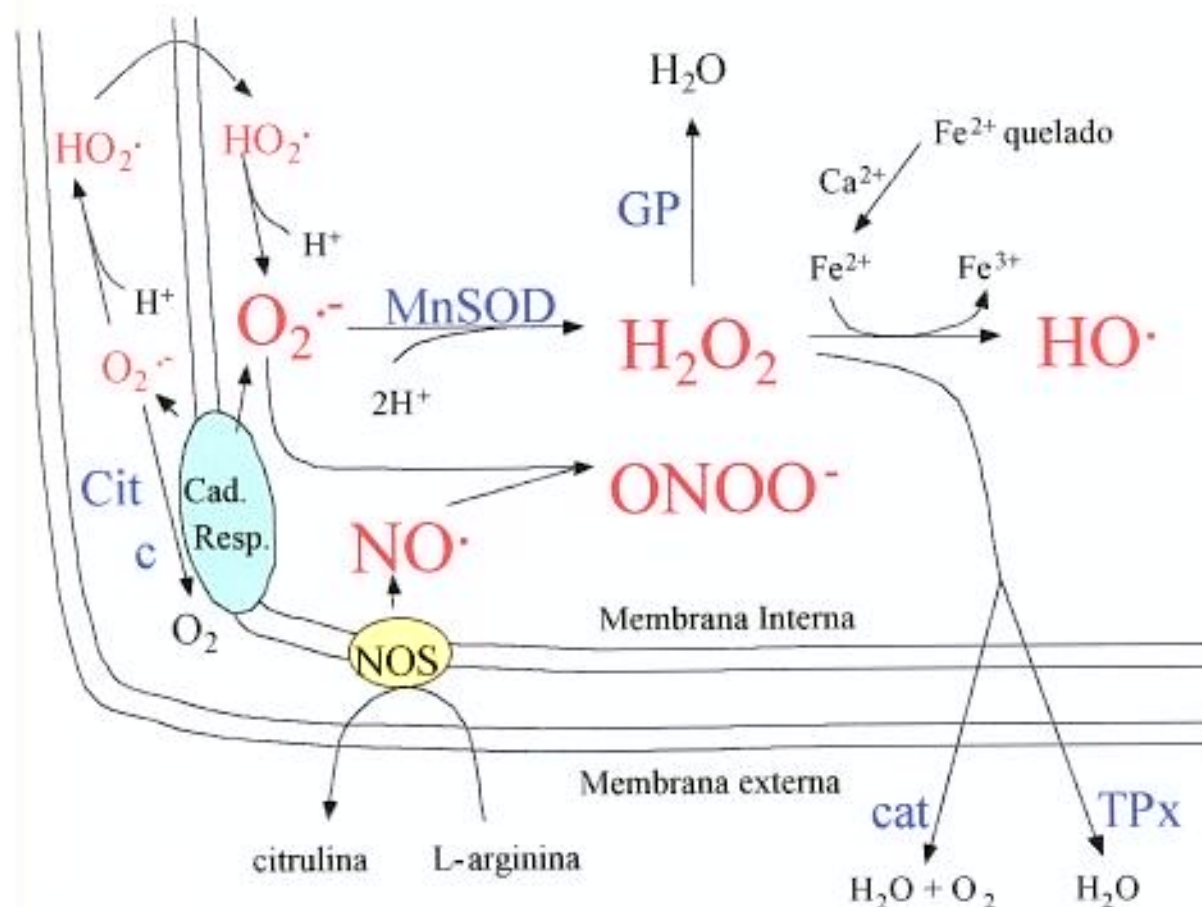
A coenzima Q é, provavelmente, o sítio mais importante de vazamento de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Isso se deve à doação de elétrons da UQH $^{\cdot}$ (que é um radical livre) para o oxigênio molecular. O vazamento de elétrons ao nível da coenzima Q é estimulado por succinato, cianeto e antimicina A (BOVERIS, CADENAS, STOPPANI, 1976; CADENAS *et al.*, 1977; TURRENS, 1997; TURRENS *et al.*, 1985; KOWALTOWSKI,

COSTA, VERCESI, 1998a). A antimicina A tem um efeito estimulatório notavelmente grande, porque bloqueia a formação de UQH^+ na face matricial da membrana mitocondrial interna, promovendo o acúmulo de UQH^+ formado anteriormente na face citosólica da membrana (veja esquema I). O mixotiazol, um inibidor da formação de UQH^+ na face citosólica da membrana mitocondrial interna, previne a formação de O_2^- pela coenzima Q (TURRENS *et al.*, 1985; DAWSON, 1993; HANSFORD, HOGUE, MILDAZIENE, 1997; TURRENS, 1997; KOWALTOWSKI *et al.*, 1998a).

1.3. Espécies Reativas de Oxigênio Formadas pela Mitocôndria

Várias espécies reativas de oxigênio (EROs) distintas podem ser detectadas na mitocôndria (veja esquema II, página 14). O O_2^- , gerado continuamente pela cadeia respiratória mitocondrial, pode ser detectado em suspensões de partículas submitocondriais ou através do uso de indicadores permeáveis à mitocôndria como a hidroetidina (TURRENS & BOVERIS, 1980; TURRENS *et al.*, 1982; BUDD, CASTILHO, NICHOLLS, 1997). Em mitocôndrias intactas, sua detecção é dificultada devido a sua baixa difusibilidade e alta reatividade. Provavelmente, a difusão de O_2^- através da membrana mitocondrial ocorre pela combinação de O_2^- e prótons, gerando o radical perhidroxil ($HO_2^{\cdot}$) (LIU, 1997).

O O_2^- gerado pela mitocôndria pode ser rapidamente dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase intramitocondrial dependente de manganês (MnSOD – veja esquema II). O H_2O_2 não pode ser classificado como um radical livre, pois não possui elétron desemparelhado, mas é considerado um espécie reativa de oxigênio devido ao seu poder oxidativo. Por ser mais estável e difusível que o O_2^- , o H_2O_2 pode ser detectado



Esquema II – EROs Detectáveis na Mitocôndria e Sistemas Antioxidantes. A

cadeia respiratória mitocondrial (Cad. Resp.) gera $O_2^{\cdot -}$, que é dismutado a H_2O_2 pela Mn-superoxídeo dismutase mitocondrial (MnSOD), combinado com um próton para gerar $HO_2^{\cdot}$ ou oxidado a O_2 pelo citocromo c (cit c). O H_2O_2 pode ser detoxificado pela glutathione peroxidase (GP), catalase (cat) ou tioredoxina peroxidase (TPx). Alternativamente, pode gerar $HO^{\cdot}$ na presença de Fe^{2+} . $NO^{\cdot}$ é gerado pela sintase de óxido nítrico mitocondrial (NOS), e pode se combinar com $O_2^{\cdot -}$, gerando $ONOO^{\cdot -}$.

com maior facilidade em suspensões mitocondriais (LOSCHEN, AZZI, FLOHE, 1973; LOSCHEN & AZZI, 1975; BOVERIS *et al.*, 1976; KOWALTOWSKI *et al.*, 1995; KOWALTOWSKI *et al.*, 1996; 1998a; 1998b; KORSHUNOV, SKULACHEV, STARKOV, 1997). Devido a essa propriedade, a detecção de H_2O_2 é frequentemente usada como indicador de estresse oxidativo mitocondrial.

O H_2O_2 , na presença de Fe^{2+} , gera o radical hidroxil ($HO^\bullet$) (SUTTON & WINTERBORN, 1989). Normalmente a ocorrência desta reação é inibida, pois a maior parte do Fe^{2+}/Fe^{3+} intramitocondrial é mantido ligado a moléculas complexantes de alto peso molecular, que impedem essa reação. Porém, a presença de íons Ca^{2+} na matriz mitocondrial pode aumentar a disponibilidade de íons Fe^{2+} ligados a complexantes de baixo peso molecular (CASTILHO *et al.*, 1995b; MERRYFIELD & LARDY, 1982). O $HO^\bullet$ é um radical extremamente reativo, com meia vida curta (LUBEC, 1996), tornando sua detecção em sistemas biológicos muito complexa. Mesmo assim, o $HO^\bullet$ foi detectado em partículas submitocondriais (GIULIVI, BOVERIS, CADENAS, 1995; GRIJALBA, VERCESI, SCHREIER, 1999).

Recentemente, foi caracterizada uma sintase de óxido nítrico localizada na membrana mitocondrial interna, capaz de gerar óxido nítrico ($NO^\bullet$) através da oxidação de L-arginina (GIULIVI *et al.*, 1998; TATOYAN & GUILIVI, 1998). $NO^\bullet$ gerado pela mitocôndria pode modular as taxas de respiração e síntese de ATP, pois inibe a citocromo *c* oxidase. Além disso, o $NO^\bullet$ gerado pela mitocôndria pode reagir com $O_2^{\cdot-}$, gerando outra espécie reativa de oxigênio, o peroxinitrito ($ONOO^-$) (PRYOR & SQUADRITO, 1995).

1.4. Condições que Alteram a Geração de EROs Mitocondrial

Existem diversas condições que podem alterar a geração mitocondrial de EROs (SKULACHEV, 1997). Um exemplo clássico consiste em utilizar um protonóforo para diminuir levemente o potencial de membrana mitocondrial, desacoplando a relação entre a respiração e potencial de membrana. Nessas condições, ocorre uma diminuição significativa da geração mitocondrial de EROs (KORSHUNOV *et al.*, 1997; SKULACHEV, 1997). O desacoplamento mitocondrial pode ser promovido também por hormônios tireoideanos (SKULACHEV, 1997; BOBLYLEVA *et al.*, 1998), ácidos graxos translocados pelo trocador de nucleotídeos de adenina (KORSHUNOV *et al.*, 1998) ou através da ativação de proteínas desacopladoras mitocondriais, também promovida por ácidos graxos (NÈGRE-SALVAYRE *et al.*, 1997; KOWALTOWSKI *et al.*, 1998a). Acredita-se que a diminuição da geração de EROs em mitocôndrias ligeiramente desacopladas esteja relacionada ao aumento das taxas de respiração, que reduz o tempo de vida da UQH[•], prevenindo sua doação de elétrons para o O₂ (SKULACHEV, 1997). É possível também que o aumento das taxas respiratórias cause uma diminuição na tensão de oxigênio no microambiente mitocondrial, prevenindo assim a formação de O₂⁻ (SKULACHEV, 1997).

Apesar do desacoplamento mitocondrial geralmente prevenir a formação de O₂⁻, protonóforos podem aumentar a geração mitocondrial de EROs em algumas situações específicas. Por exemplo, protonóforos aumentam a geração de EROs em mitocôndrias em que a respiração foi previamente inibida pela adição de antimicina A, ou quando as mitocôndrias foram previamente carregadas com Ca²⁺ e tratadas com vermelho de rutênio para inibir a liberação mitocondrial de Ca²⁺ (KOWALTOWSKI, CASTILHO, VERCESI, 1996).

Outra situação de relevância patológica que afeta a geração mitocondrial de EROs são alterações nas tensões de oxigênio do microambiente mitocondrial. Obviamente, a incubação de mitocôndrias em um ambiente na ausência total de oxigênio (anóxia) previne a formação de EROs. Porém, na presença de baixas concentrações de oxigênio (hipóxia), a geração mitocondrial de EROs pode tanto se encontrar aumentada como inibida (DELGI ESPOSTI & MCLENNAN, 1998; VANDEN HOEK *et al.*, 1998; DURANTEAU *et al.*, 1998; COSTA, LLESUY, BOVERIS, 1993; YANG *et al.*, 1995). Em condições hiperóxicas, a geração mitocondrial de EROs é estimulada (BOVERIS & CHANCE, 1973; JAMIESON *et al.*, 1986). É interessante também mencionar que mitocôndrias incubadas em anóxia e depois suplementadas com oxigênio (uma experimento *in vitro* que simula a isquemia/reperfusão) geram quantidades aumentadas de EROs logo após a reoxigenação (KOWALTOWSKI *et al.*, 1995). Resultados similares foram obtidos em tecidos miocárdicos (BOLLI *et al.*, 1988; 1989). Nessas condições, EROs geradas pela mitocôndria podem ter uma participação importante na gênese de lesões teciduais associadas à isquemia/reperfusão (BOLLI, 1998; KRISTIAN & SIESJO, 1998; FISKUM, MURPHY, BEAL, 1998).

Como mencionado anteriormente, mitocôndrias são capazes de captar Ca^{2+} ativamente às custas de seu potencial eletroquímico, quando a concentração extramitocondrial de Ca^{2+} se eleva a valores acima de $0.5 \mu\text{M}$ (NICHOLLS & FERGUSON, 1982). A acumulação de Ca^{2+} na matriz mitocondrial estimula significativamente a geração mitocondrial de EROs (CADENAS & BOVERIS, 1980; CASTILHO *et al.*, 1995b; KOWALTOWSKI *et al.*, 1995; 1996). A causa para esse aumento da geração mitocondrial de EROs na presença de Ca^{2+} é desconhecida, mas a necessidade da presença de Ca^{2+} na matriz mitocondrial é evidenciada pelo efeito inibitório do vermelho de rutênio (MEINICKE, BECHARA,

VERCESI, 1997). A ligação desse Ca^{2+} à membrana mitocondrial parece também ser necessária, pois a dibucaina, que impede a ligação de Ca^{2+} em membranas biológicas, previne esse efeito do Ca^{2+} (KOWALTOWSKI *et al.*, 1998b). É possível que o Ca^{2+} se ligue a cardiolipina, o único fosfolípídeo da membrana mitocondrial interna com cabeça polar negativamente carregada, causando desestruturação da cadeia respiratória mitocondrial e aumento da geração mitocondrial de EROs (GRIJALBA *et al.*, 1999).

O aumento da geração mitocondrial de EROs causado por Ca^{2+} pode representar um passo necessário para a ocorrência da morte neuronal induzida por hiperestimulação de receptores *N*-metil-D-aspartato (GUNASEKAR *et al.*, 1995; REYNOLDS & HASTINGS, 1995). Comprovando essa hipótese, foi demonstrado que a inibição da captação mitocondrial de Ca^{2+} ou tratamento com antioxidantes previnem a morte celular nessas condições (BUDD & NICHOLLS, 1996a e b; CASTILHO *et al.*, 1998b; CASTILHO *et al.*, 1999).

1.5. Defesas Antioxidantes

Como a geração mitocondrial de EROs é um processo contínuo mesmo em condições fisiológicas, essas organelas desenvolveram sistema antioxidante bastante eficaz (veja esquema II, página 14). A Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD), semelhante à superóxido dismutase bacteriana (DOONAN, BARRA, BOSSA, 1984), faz parte desse sistema antioxidante, sendo capaz de catalizar a dismutação de O_2^- para H_2O_2 . As mitocôndrias contêm também glutathione peroxidase (ZAKOWSKI & TAPPEL, 1987; SIES & MOSS, 1978), uma peroxidase tiólica responsável pela remoção de H_2O_2 , utilizando glutathione reduzida como substrato. A forma oxidada da glutathione resultante pode ser recuperada às custas da oxidação de NADPH

através da glutathiona redutase. Como o potencial elétrico transmembrana favorece a redução de NADPH, (HOEK & RYDSTRON, 1988), o desacoplamento mitocondrial na presença de Ca^{2+} intramitocondrial pode levar a uma condição de estresse oxidativo (KOWALTOWSKI *et al.*, 1996). O tratamento de suspensões mitocondriais com oxidantes de NAD(P)H, como o *t*-butil hidroperóxido, também promove estresse oxidativo mitocondrial, resultando em permeabilização não seletiva da membrana da organela (LEHNINGER, VERCESI, BABABUNMI, 1978; CASTILHO *et al.*, 1995b; VERCESI *et al.*, 1997 – veja item 1.6.2.). Além da glutathiona peroxidase, as mitocôndrias podem conter também isoformas da tioredoxina peroxidase (RIGOBELLO *et al.*, 1998; WATABE *et al.*, 1997) e catalase (RADI *et al.*, 1991).

Alguns componentes da própria cadeia respiratória mitocondrial podem agir como antioxidantes. O citocromo *c* é um exemplo interessante, pois sua forma oxidada pode receber um elétron do O_2^- , regenerando o O_2 e reintroduzindo o elétron “perdido” na cadeia respiratória (SKULACHEV, 1998; CAI & JONES, 1998). Outro componente da cadeia respiratória que pode agir como antioxidante, prevenindo a peroxidação lipídica da membrana mitocondrial interna é a UQH_2 (CASTILHO *et al.*, 1995a). A lipoperoxidação também pode ser inibida por vitamina E mitocondrial (ERNSTER, FORSMARK, NORDENBRAND, 1992).

De modo geral, as defesas antioxidantes mitocondriais são suficientes para evitar a ocorrência de danos oxidativos a componentes da organela em condições fisiológicas. Porém, em condições em que a geração mitocondrial de EROs se encontra aumentada (veja item 1.4.), a mitocôndria pode acumular EROs e sofrer consequências do estresse oxidativo.

1.6. Lesões Mitocondriais Causadas por EROs em Condições de Estresse Oxidativo

O acúmulo de EROs mitocondriais pode levar à lesão oxidativa de praticamente qualquer componente mitocondrial. Porém, como a maioria das EROs são produzidas pela cadeia respiratória, é esperado que os componentes mitocondriais localizados próximos à cadeia respiratória sejam alvos preferenciais dessas EROs. Assim, iremos concentrar nossas atenções neste trabalho em lesões oxidativas a lipídeos e proteínas da membrana mitocondrial interna.

1.6.1. Oxidação de proteínas de membrana mitocondrial.

Possíveis reações entre EROs e proteínas incluem a quebra de ligações peptídicas, resultando em fragmentação protéica, oxidação de aminoácidos (principalmente aqueles contendo resíduos de enxofre como a cisteína ou a metionina) e a geração de derivados carbonílicos (BERLETT & STADTMAN, 1997). A ocorrência dessas alterações a componentes da cadeia respiratória é, provavelmente, a causa da inibição respiratória associada a estresse oxidativo mitocondrial (SALGANIK *et al.*, 1994; MYERS *et al.*, 1995; ZWICKER *et al.*, 1998; XIE, KAMINSKI, WOLIN, 1998).

1.6.2. Transição de Permeabilidade Mitocondrial

Uma forma específica de oxidação de proteínas da membrana mitocondrial interna, que ocorre na presença de íons Ca^{2+} , resulta em permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna, um processo conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (ZORATTI & SZABÒ, 1995; BERNARDI, 1996; VERCESI *et al.*, 1997). Além de

ser dependente de Ca^{2+} , a TPM é caracterizada por ser inibida pela ciclosporina A, um imunossupressor (ZORATTI & SZABÒ, 1995).

Apesar do principal desencadeante de TPM ser o Ca^{2+} , sabe-se que a TPM pode ser estimulada por uma variedade de outras substâncias, conhecidas como indutores (veja um lista em ZORATTI & SZABÒ, 1995). Entre os indutores de TPM são encontrados o fosfato inorgânico (ROSSI & LEHNINGER, 1964), oxidantes de nucleotídeos de piridina (LEHNINGER *et al.*, 1978; VERCESI, 1984; BERNARDES *et al.*, 1986), reagentes ditiólicos (LENARTOWICS, BERNARDI, AZZONE, 1991; BERNARDES *et al.*, 1994), protonóforos (HARRIS, AL-SHAikhaly, BAUM, 1979; BERNARDI, 1992) e hormônios tireoideanos (HARRIS *et al.*, 1979; CASTILHO *et al.*, 1998a). A grande variação em características químicas dos indutores de TPM tem tornado bastante complexo o estabelecimento de um mecanismo comum para explicar a ocorrência de TPM.

Com o intuito de estabelecer um mecanismo comum através do qual diferentes indutores levam à TPM, nesse trabalho estudamos a possibilidade da TPM induzida por fosfato inorgânico ser promovida por EROs gerados pela mitocôndria. Resultados prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a TPM causada por oxidantes de nucleotídeos de piridina, protonóforos e hormônios tireoideanos é dependente de EROs mitocondriais (como revisão, veja VERCESI *et al.*, 1997; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Para comprovar que EROs mitocondriais são responsáveis pela oxidação de proteínas da membrana mitocondrial que leva à TPM, foram realizados experimentos em meio anóxico. Nessas condições, não se observa TPM induzida por oxidantes de nucleotídeos de piridina, protonóforos ou hormônios tireoideanos, mas ainda é possível promover a TPM com o uso de reagentes ditiólicos, capazes de se ligar diretamente a proteínas de membrana (CASTILHO *et*

al., 1995b; KOWALTOWSKI *et al.*, 1996; CASTILHO *et al.*, 1996). Na presença de oxigênio, a TPM induzida por oxidantes de nucleotídeos de piridina, protonóforos ou hormônios tireoideanos é inibida pela catalase, mais uma evidência da participação de EROs mitocondriais (VALE *et al.*, 1993; CASTILHO *et al.*, 1995b; KOWALTOWSKI *et al.*, 1996; CASTILHO *et al.*, 1996).

O uso do termo “transição” se deve à propriedade da TPM poder ser revertida (HUNTER & HAWORTH, 1979a; 1979b; HAWORTH & HUNTER, 1979). Foi observado que a quelação de íons Ca^{2+} após a permeabilização mitocondrial induzida por TPM leva a uma recuperação parcial da impermeabilidade da membrana mitocondrial interna, com recuperação de funções mitocondriais. Para obtenção de uma reversão completa da impermeabilidade da membrana mitocondrial interna, é necessária a adição de quelantes de Ca^{2+} associados a redutores ditiólicos (que revertem a oxidação de grupamentos tiólicos protéicos) (VALLE *et al.*, 1993) ou ADP, um potente inibidor da TPM (por promover alterações de conformação no translocador de nucleotídeos de adenina) (CASTILHO *et al.*, 1996). Esses resultados, além de demonstrar que a TPM ocorre secundariamente à oxidação de tióis de proteínas da membrana mitocondrial, sugerem fortemente a participação do translocador do nucleotídeo de adenina na formação do poro não seletivo que leva à TPM.

O translocador de nucleotídeos de adenina, quando isolado e reconstituído em lipossomos, apresenta comportamento de um poro quando tratado com Ca^{2+} . Porém, várias características da TPM não são compatíveis com o poro formado isoladamente pelo translocador de nucleotídeos de adenina (BRUSTOVETSKY & KLINGENBERG, 1996). Deste modo, propõem-se que o poro da TPM seja formado por uma associação de vários componentes mitocondriais. No entanto, apesar de intensos estudos, ainda não são bem

estabelecidas quais as proteínas da membrana mitocondrial que, quando oxidadas, promovem a TPM. A hipótese mais provável é a de que o translocador de nucleotídeos de adenina, a porina, a hexoquinase e a ciclofilina interagem para formar o poro da TPM (HALESTRAP *et al.*, 1998).

Durante muito tempo, não se conhecia a função da TPM na fisiopatologia celular. Questionava-se até que pudesse ocorrer TPM em células devido ao baixo Ca^{2+} intracelular, e à presença de Mg^{2+} , ATP e espermina no citosol, que são potentes inibidores da TPM. No entanto, recentemente se caracterizou a ocorrência de TPM em células intactas (DUBINSKY & LEVI, 1998; LEMASTERS *et al.*, 1998; HALESTRAP *et al.*, 1998). Apesar de alguns autores proporem que a TPM possa ter uma função fisiológica na célula (LEHNINGER *et al.*, 1978; GUNTER *et al.*, 1994; BERNARDI & PETRONILLI, 1996), as grandes alterações da função mitocondrial que ocorrem na TPM parecem ser incompatíveis com essa hipótese. Nesse sentido, têm sido proposto que a TPM pode agir como um passo inicial da morte celular tanto apoptótica como necrótica (veja item 1.7.) (LEMASTERS *et al.*, 1998; SUSIN *et al.*, 1998; SKULACHEV, 1998; MURPHY *et al.*, 1999; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

1.6.3. Peroxidação lipídica da membrana mitocondrial interna

As proteínas são alvos preferenciais das EROs mitocondriais devido ao alto conteúdo protéico da membrana mitocondrial interna. No entanto, em condições de estresse oxidativo mitocondrial podem ocorrer também lesões oxidativas de lipídeos da membrana mitocondrial (GABBITA *et al.*, 1998). A lipoperoxidação da membrana mitocondrial é uma lesão importante, pois além de ser um processo que se auto-propaga devido à formação de radicais

lipídicos, pode afetar a função de componentes da membrana intimamente ligados a lipídeos e pode promover permeabilização não específica e irreversível da membrana mitocondrial interna (KAPPUS, 1985; Castilho *et al.*, 1994).

A lipoperoxidação mitocondrial é melhor estudada quando induzida por íons Fe^{2+} ligados a complexantes de baixo peso molecular como o citrato, ATP, ADP ou GTP (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Este processo é relevante em doenças que envolvem o acúmulo de ferro, como a hemocromatose (BACON & BRITTON, 1990). Interessantemente, a lipoperoxidação da membrana mitocondrial interna causada por Fe^{2+} é também dependente de íons Ca^{2+} (CASTILHO *et al.*, 1994; CASTILHO *et al.*, 1995a; GRIJALBA *et al.*, 1998).

Outra condição que leva à peroxidação lipídica da membrana mitocondrial interna é o tratamento de mitocôndrias isoladas com acetona no estado triplete (NANTES *et al.*, 1995). Como o fosfato inorgânico é capaz de catalizar a geração de espécies tripletes na mitocôndria, um dos pontos de interesse de nossos estudos foi verificar se a lipoperoxidação pode acompanhar a TPM induzida por fosfato e Ca^{2+} .

1.7. Efeitos do Estresse Oxidativo Mitocondrial na Integridade Celular

Quando uma célula é submetida a uma situação de estresse suficientemente intensa para que haja dano irreversível às suas funções essenciais, ocorre a morte celular acidental, ou necrose. Por outro lado, a maioria das células de organismos multicelulares possuem mecanismos que as possibilitam morrer (ou promover "suicídio") fora de situações de dano celular

irrecuperável, num processo conhecido como apoptose (para revisões, veja STELLER, 1995 e DUKE, OJCIUS, YOUNG, 1996). A apoptose é uma sequência de eventos bem definida em que a célula encolhe, forma bolhas em sua superfície e apresenta condensação e fragmentação de cromatina nuclear. Este processo pode ser fisiológico e é necessário para a vida de seres multicelulares, pois elimina células desnecessárias ou disfuncionais. A falha da ocorrência da apoptose pode levar ao surgimento de cânceres e doenças autoimunes, enquanto a ocorrência de apoptose excessiva foi encontrada em linfócitos de pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS - DUKE *et al.*, 1996).

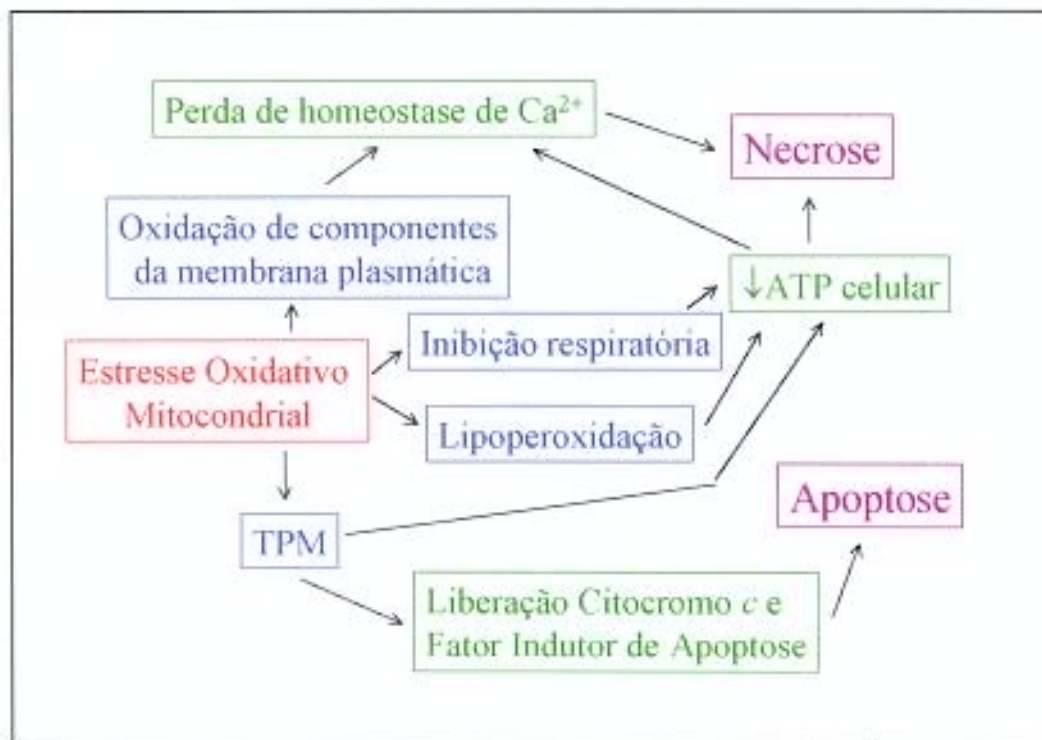
A função mitocondrial é essencial para a manutenção dos níveis celulares de ATP e integridade da célula. Deste modo, é esperado que a disfunção mitocondrial secundária a estresse oxidativo da organela possa levar a lesão e morte celular por vários mecanismos (veja esquema III, página 27). Como exemplo, após a TPM há perda da impermeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons, resultando em comprometimento da fosforilação de ADP. Nesta situação, é esperado que ocorra morte celular se a permeabilização afetar um grande grupo de mitocôndrias. De fato, alterações da homeostase de Ca^{2+} , levando a aumentos sustentados da concentração de Ca^{2+} citosólico e TPM, têm sido relacionados à morte celular necrótica, devido à disfunção mitocondrial que ocorre após a TPM (RICHTER, 1993; LEMASTERS & NIEMINEN, 1997). Deste modo, a TPM tem sido implicada em lesões teciduais em situações patológicas como a isquemia/reperfusão (NAZARETH, NASSER, CROMPTON, 1991; PASTORINO *et al.*, 1993; GRIFITHS & HALESTRAP, 1995).

O estresse oxidativo mitocondrial pode também desencadear a apoptose, como comprova um estudo detalhado da apoptose induzida por p53 (POLYAK *et al.*, 1997), que revelou que este gene promove a transcrição de genes relacionados ao estado redox celular,

levando a estresse oxidativo celular. Em seguida, ocorrem alterações oxidativas de componentes mitocondriais e morte celular. O bongkrekato, um ligante do translocador de ADP/ATP que inibe a TPM, não reduz a transcrição de genes relacionados ao estado redox e geração de EROs, mas inibe a morte celular.

Uma evidência forte de que a TPM é uma causa de apoptose foi apresentada pelo grupo do Professor G. Kroemer (ZAMZAMI *et al.*, 1997) que demonstraram que a ocorrência de TPM leva à liberação de uma proteína pré-formada do espaço intermembranas mitocondrial, o “fator indutor de apoptose”. Esta proteína, quando isolada, promove alterações apoptóticas em núcleos isolados ou células microinjetadas (ZAMZAMI *et al.*, 1997; SUSIN *et al.*, 1999). O Bcl-2, uma proteína antiapoptótica presente em mitocôndrias, inibe a ocorrência de TPM, a liberação do “fator indutor de apoptose” e morte celular consequente (MYERS *et al.*, 1995; MURPHY *et al.*, 1996; SUSIN *et al.*, 1996; ZAMZAMI *et al.*, 1997). Alternativamente, foi sugerido que o mediador mitocondrial de apoptose poderia ser o citocromo *c*, que, liberado durante a TPM, levaria à ativação de caspases citosólicas, promovendo a apoptose (KLUCK *et al.*, 1997; ADACHI *et al.*, 1997). Realmente, a injeção intracitoplasmática de citocromo *c* é suficiente para desencadear a apoptose (ZHIVOTOVSKI *et al.*, 1998). A liberação mitocondrial de citocromo *c* é também inibida por Bcl-2 (KLUCK *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1997).

Mesmo quando a disfunção mitocondrial oxidativa não leva à morte celular, a geração excessiva de EROs pela mitocôndria pode levar a alterações também a componentes da própria célula. Nesse sentido, foi comprovado que a captação mitocondrial de Ca^{2+} , seguida de estresse oxidativo da organela, leva a uma desregulação tardia da homeostase de Ca^{2+} em neurônios tratados com glutamato (GUNASEKAR *et al.*, 1995; REYNOLDS & HASTINGS,



**Esquema III- Consequências do Estresse Oxidativo Mitocondrial que Podem
Levar à Morte Celular Necrótica ou Apoptótica.**

1995; BUDD & NICHOLLS, 1996; CASTILHO *et al.*, 1998b). É proposto que esta desregulação ocorre devido à lesão oxidativa de sistemas de transporte de Ca^{2+} da membrana plasmática, podendo ser prevenida por antioxidantes ou inibindo-se a captação mitocondrial de Ca^{2+} (CASTILHO *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS

O conjunto de trabalhos apresentados teve como objetivos:

2.1 - Estudar o envolvimento de EROs produzidas pela mitocôndria na TPM induzida por fosfato inorgânico (P_i) e Ca^{2+} . Nosso grupo já demonstrou que a TPM induzida por prooxidantes como o *t*-butil hidroperóxido depende da geração de EROs mitocondriais (VALLE *et al.*, 1993; CASTILHO *et al.*, 1994). Porém, em condições *in vivo*, íons Ca^{2+} e P_i são os principais indutores de TPM (ZORATTI & SZABÓ, 1995). Não existem evidências de que o P_i possa agir diretamente como um prooxidante, depletando as defesas antioxidantes mitocondriais. No entanto, a propriedade de estimular a TPM induzida por Ca^{2+} sugere que o P_i possa agir sinergisticamente com o Ca^{2+} , estimulando o estresse oxidativo mitocondrial.

2.2 – Verificar se a permeabilização mitocondrial induzida por P_i e Ca^{2+} envolve somente TPM, ou lesões oxidativas associadas. É pouco provável que o estresse oxidativo mitocondrial cause somente a oxidação de grupamentos tiólicos proteicos levando à TPM. Assim, pretendemos verificar se associada à TPM induzida por P_i e Ca^{2+} ocorrem outras lesões oxidativas mitocondriais, como a peroxidação lipídica da membrana mitocondrial. A ocorrência de peroxidação lipídica associada à TPM é de grande relevância, pois promove uma lesão mitocondrial irreversível (BRITTON, 1996; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

2.3 - Estudar os efeitos de proteínas inibitórias de apoptose, como a tiorredoxina peroxidase e Bcl-2, na TPM. Sabe-se que a TPM pode agir como desencadeante da apoptose, e é possível que essas proteínas apresentem efeitos antiapoptóticos por inibirem a TPM (ZHANG *et al.*, 1997; REED, JURGENSMEIER, MATSUYAMA, 1998).

3. RESULTADOS

3.1. - 1º Trabalho

KOWALTOWSKI, A.J., CASTILHO, R.F., GRIJALBA, M.T., BECHARA, E.J.H. E VERCESI, A.E. Effect of Inorganic Phosphate Concentration on the Nature of Inner Mitochondrial Membrane Alterations Mediated by Ca^{2+} Ions: A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J. Biol Chem.** 271:2929-2934, 1996.

3.1.1. Introdução ao 1º Trabalho

Em 1978, LEHNINGER *et al.* observaram que a liberação de Ca^{2+} por mitocôndrias podia ser promovida pela oxidação de nucleotídeos de piridina por acetoacetato ou oxaloacetato. Esse trabalho foi o primeiro a sugerir que a TPM poderia ser causada por condições de estresse oxidativo mitocondrial, pois o acetoacetato e oxaloacetato induzem um estado de estresse oxidativo mitocondrial através da oxidação de NAD(P)H, substrato da enzima glutathione peroxidase (veja item 1.5.). Posteriormente, trabalhos subsequentes de nosso laboratório comprovaram que a permeabilização mitocondrial induzida por oxidantes de nucleotídeos de adenina era causada por EROs geradas pela mitocôndria (FAGIAN *et al.*, 1990; VALLE *et al.*, 1993; CASTILHO *et al.*, 1995a).

Nesse trabalho, comprovamos a participação de EROs na permeabilização mitocondrial induzida por Ca^{2+} e fosfato inorgânico (P_i), uma situação de maior

importância fisiopatológica. Para essa comprovação, foram realizados experimentos em que a permeabilização mitocondrial era avaliada através do inchamento mitocondrial, acompanhado pela diminuição da absorbância da suspensão mitocondrial. O fato dessa permeabilização mitocondrial ser fortemente inibida por catalase sugeriu a participação de EROs na permeabilização mitocondrial. A participação de EROs foi depois confirmada através da medida, utilizando a peroxidase de raiz forte, de um aumento na geração de H_2O_2 mitocondrial antecedendo à permeabilização mitocondrial.

Interessantemente, durante os estudos conduzidos, pudemos verificar que na presença de uma concentração baixa (1 mM) de P_i a permeabilização mitocondrial era causada praticamente de maneira exclusiva pela TPM (veja item 1.6.2.), podendo ser inibida por ciclosporina A. Porém, na presença de concentrações maiores de P_i (2-5 mM), a ciclosporina já não prevenia totalmente a permeabilização mitocondrial, pois essa era acompanhada de peroxidação lipídica da membrana mitocondrial (veja item 1.6.3.), evidenciada pelo aparecimento de produtos reativos com ácido tiobarbitúrico.

1º Trabalho

3.1.2. EFFECT OF INORGANIC PHOSPHATE CONCENTRATION ON THE NATURE OF INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE ALTERATIONS MEDIATED BY Ca^{2+} IONS: A PROPOSED MODEL FOR PHOSPHATE-STIMULATED LIPID PEROXIDATION.

Effect of Inorganic Phosphate Concentration on the Nature of Inner Mitochondrial Membrane Alterations Mediated by Ca^{2+} Ions

A PROPOSED MODEL FOR PHOSPHATE-STIMULATED LIPID PEROXIDATION*

(Received for publication, July 21, 1995, and in revised form, November 22, 1995)

Alicia J. Kowaltowski[§], Roger F. Castilho[§], Mercedes T. Grijalbal,
Etelvino J. H. Bechara^{||}, and Anibal E. Vercesi^{||}

From the [§]Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP and
the ^{||}Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Addition of high concentrations (>1 mM) of inorganic phosphate (P_i) or arsenate to Ca^{2+} -loaded mitochondria was followed by increased rates of H_2O_2 production, membrane lipid peroxidation, and swelling. Mitochondrial swelling was only partially prevented either by butylhydroxytoluene, an inhibitor of lipid peroxidation, or cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. This swelling was totally prevented by the simultaneous presence of these compounds. At lower P_i concentrations (1 mM), mitochondrial swelling is reversible and prevented by cyclosporin A, but not by butylhydroxytoluene. In any case (low or high phosphate concentration) exogenous catalase prevented mitochondrial swelling, suggesting that reactive oxygen species (ROS) participate in these mechanisms. Altogether, the data suggest that, at low P_i concentrations, membrane permeabilization is reversible and mediated by opening of the mitochondrial permeability transition pore, whereas at high P_i concentrations, membrane permeabilization is irreversible because lipid peroxidation also takes place. Under these conditions, lipid peroxidation is strongly inhibited by sorbate, a putative quencher of triplet carbonyl species. This suggests that high P_i or arsenate concentrations stimulate propagation of the peroxidative reactions initiated by mitochondrial-generated ROS because these anions are able to catalyze C_{α} -aldehyde tautomerization producing enols, which can be oxidized by heme proteins to yield the lower $\text{C}_{\alpha-1}$ -aldehyde in the triplet state. This proposition was also supported by experiments using a model system consisting of phosphatidylcholine/dicetylphosphate liposomes and the triplet acetone-generating system isobutanol/horseradish peroxidase, where phosphate and Ca^{2+} cooperate to increase the yield of thiobarbituric acid-reactive substances.

results in inorganic phosphate (P_i) accumulation and alterations in intracellular Ca^{2+} homeostasis (1–7). It is argued that high P_i concentrations mimic the metabolic conditions prevalent during ischemia and that, at concentrations higher than 10 mM, P_i inhibits mitochondrial oxidative phosphorylation (8). Indeed, it is well known (see Refs. 9 and 10, and references therein) that accumulation of Ca^{2+} and P_i by mitochondria results in increased permeability of the inner mitochondrial membrane. This is proposed to be a key step in the pathogenesis of cell injury that occurs during ischemia and reperfusion (8–11). Different mechanisms such as lipid peroxidation, phospholipid hydrolysis by phospholipase A_2 , or opening of the mitochondrial permeability transition pore (MTP)¹ have been proposed to take place under these conditions (9–14). In this regard, P_i concentration, which is reported to increase up to 20 mM in cells exposed to prolonged anoxia (6), has a profound effect in the rate, extent, and nature of mitochondrial membrane alterations caused by Ca^{2+} ions (8–11, 14–16).

Data from our laboratory (17–20) provided evidence that in the absence of added P_i , the membrane alterations caused by Ca^{2+} seem to be mediated mainly by the attack of mitochondrial generated reactive oxygen radicals (ROS) to membrane proteins, resulting in opening of the MTP, a mechanism sensitive to cyclosporin A (9, 10). This process is stimulated by prooxidants such as *t*-butyl hydroperoxide or diamide (17, 19, 21), which exhaust mitochondrial reducing power such as NAD(P)H and GSH (9, 22). Under these conditions, the rate of lipid peroxidation is low and the membrane can be quickly resealed by the addition of EGTA and disulfide reductants (17, 21). In contrast, lipid peroxidation is the main form of irreversible mitochondrial membrane permeabilization caused by Ca^{2+} in the presence of other oxidants such as Fe(II)citrate or Fe(II)ATP (23, 24). Interestingly, other data (18, 20) from our laboratory indicate that, while the reduced state of coenzyme Q stimulates the protein oxidation that occurs in the presence of Ca^{2+} and *t*-butyl hydroperoxide, it protects against damage that occurs in the presence of Ca^{2+} and Fe(II)citrate. This supports the notion that mitochondrial membrane alterations caused by Ca^{2+} in situations of oxidative stress may occur via protein thiol oxidation and/or lipid peroxidation.

The aim of this study was to investigate the mechanisms underlying the stimulation of Ca^{2+} -mediated mitochondrial inner membrane permeabilization by different P_i concentrations. Phosphate is the earliest "inducing agent" described (see

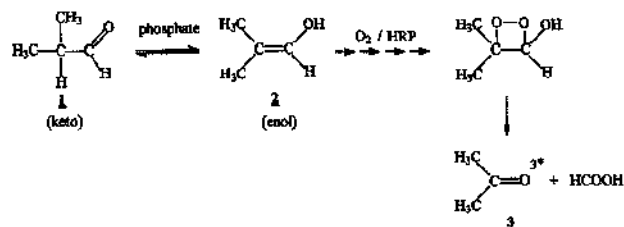
The decrease in ATP levels that occurs under pathological conditions such as prolonged anoxia or ischemia/reperfusion

* This work was partially supported by grants from the Brazilian Agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Financiadora de Estudos e Projetos, and Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Supported by a CNPq scholarship.

|| Visiting professor in the Departamento de Bioquímica, IQ, Universidade de São Paulo, supported by FAPESP. To whom correspondence should be addressed: Depto. de Bioquímica, IB, UNICAMP, CP 6109, CEP 13084-100, Campinas, SP, Brazil. Tel.: 55-192-397953; Fax: 55-192-393124.

¹ The abbreviations used are: MTP, mitochondrial permeability transition pore; BHT, butylhydroxytoluene; DCP, dicetylphosphate; HRP, horseradish peroxidase; IBAL, isobutanol; PC, phosphatidylcholine; RLM, rat liver mitochondria; ROS, reactive oxygen species; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances; PUFA, polyunsaturated fatty acid(s).



SCHEME 1. HRP-catalyzed generation of triplet acetone from isobutanol.

Refs. 9 and 10, and references therein), and the molecular mechanism by which it mediates membrane permeabilization promoted by Ca^{2+} remains unclear. Phosphate accumulation, which accompanies intracellular Ca^{2+} increase during pathological situations, such as prolonged ischemia and reperfusion (see Ref. 8 and references therein), attests to the relevance of this study. Our hypothesis is that high P_i concentrations and Ca^{2+} act synergistically increasing the extent of irreversible membrane permeabilization, due mainly to aldehyde α -peroxidation, which yields triplet carbonyls able to amplify the reaction chain of the peroxidative process (25). This was approached by examining the effect of Ca^{2+} and phosphate ions on TBARS production by mitochondria and by phosphatidylcholine/dicetylphosphate (PC/DCP) liposomes challenged with isobutanol (IBAL) (1) as a phosphate-dependent source of the enol (2), which produces triplet acetone (3) in the presence of horseradish peroxidase (HRP) (see Scheme 1). Mitochondrial swelling and H_2O_2 production were also monitored in Ca^{2+} plus phosphate-challenged mitochondria. Inhibition of TBARS production and mitochondrial swelling by sorbate, a quencher of triplet carbonyls (26), supports the proposition that P_i stimulates lipid peroxidation via aldehyde tautomerization producing enols, very reactive substrates for peroxidases.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Rat Liver Mitochondria.—Mitochondria were isolated by conventional differential centrifugation from the livers of adult Wistar strain rats fasted overnight. The homogenate was prepared in 250 mM sucrose, 1.0 mM EGTA, and 5.0 mM Hepes buffer, pH 7.2. The mitochondrial suspension was washed twice in the same medium containing 0.1 mM EGTA, and the final pellet was diluted in 250 mM sucrose to a protein concentration of 80–100 mg/ml. These mitochondria contain 8–10 nmol/mg endogenous calcium as determined by atomic absorption spectroscopy.

Liposome Preparation.—PC/DCP liposomes were prepared in deionized water by sonication in a Cole-Parmer ultrasonic homogenizer with a nominal output of 100 watts. After 20 min of sonication (with 1-min interval after each 2-min sonication), the solution was centrifuged at $10,000 \times g$ during 20 min to eliminate titanium from the preparation (27).

Standard Incubation Procedure.—The experiments were carried out at 30 °C in a reaction medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM Hepes buffer, pH 7.2, 5.0 μM rotenone, 2 mM succinate, and 10 μM Ca^{2+} as determined by atomic absorption spectroscopy. Other additions are indicated in the figure legends. The results shown are representative of a series of at least three experiments reproducible within 10%.

Oxygen Uptake Measurements.—Oxygen consumption was measured using a Clark-type electrode (Yellow Springs Instruments Co.) in a glass chamber equipped with magnetic stirring.

Determination of Mitochondrial Swelling.—Mitochondrial swelling was estimated from the decrease in the absorbance at 520 nm measured in a SLM Aminco DW2000 spectrophotometer.

Determination of H_2O_2 Production.— H_2O_2 production was determined by the horseradish peroxidase method, as described in Ref. 28.

Thiobarbituric Reactive Substances (TBARS) Measurements.—Quantification of TBARS production by mitochondria was performed according to Buege and Aust (29). Briefly, 0.4-ml samples were taken after 10 min of incubation in the conditions described above and mixed with 0.4 ml of 1% TBA in 50 mM NaOH, 0.2 ml of 20% H_3PO_4 , and 40 μl of 10 N

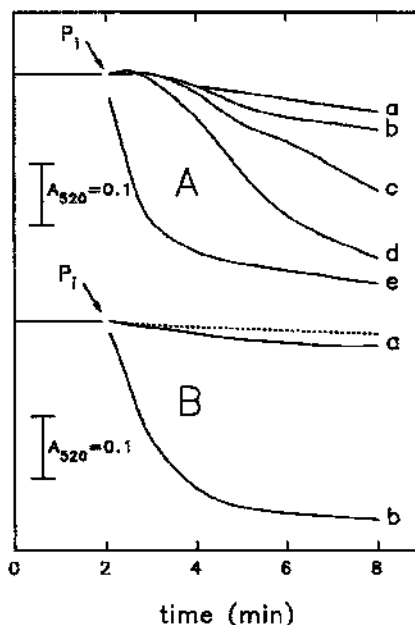


FIG. 1. Stimulation by P_i of mitochondrial swelling induced by Ca^{2+} . RLM (0.4 mg/ml) were added to standard reaction medium, containing the following: panel A: a, 5 μM BHT and 1 μM cyclosporin A; b, 2 μM catalase; c, 5 μM BHT; d, 1 μM cyclosporin A; e, no additions; panel B: a, 1 μM cyclosporin A; b, no additions. P_i (4 mM in panel A, 1 mM in panel B) was added after 2 min of mitochondrial preincubation. The dashed line represents a control experiment in the absence of added P_i .

NaOH. The mixture was heated at 80–90 °C for 15 min in the presence of 1 mM butylhydroxytoluene (BHT). After cooling, 1.5 ml of butanol was added to the solution. The mixture was shaken and centrifuged at 3000 rpm during 5 min. The optical density of the supernatant was determined at 535 nm. In these conditions, the molar extinction coefficient used to calculate TBARS concentrations is $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Chemicals.—All reagents were commercial products of the highest available grade of purity.

RESULTS

Using the classical mitochondrial swelling technique (9), we showed that addition of 4 mM P_i to a suspension of rat liver mitochondria preincubated (2 min) in reaction medium containing 10 μM Ca^{2+} results in a fast decrease in absorbance of the mitochondrial suspension compatible with extensive mitochondrial swelling (Fig. 1A, line e). The presence of catalase from the beginning of the experiment caused an almost complete inhibition of mitochondrial swelling (line b), suggesting the participation of mitochondrial generated H_2O_2 or H_2O_2 -derived radicals in this process (19). In order to ascertain the nature of the membrane alterations observed under these conditions, experiments were performed in presence of the antioxidant BHT, an inhibitor of lipid peroxidation, and of cyclosporin A, an inhibitor of MTP opening. Fig. 1 (lines c and d) shows that the mitochondrial swelling was partially prevented either by BHT or cyclosporin A, respectively, and totally prevented by the simultaneous presence of BHT and cyclosporin A (line a). This behavior is compatible with a membrane permeabilization process mediated partly by lipid peroxidation and partly by MTP opening. In contrast, data in the literature (30–32) indicate that mitochondrial swelling induced by Ca^{2+} in the presence of P_i can be totally prevented by cyclosporin A. Indeed, Fig. 1B shows that, under our experimental conditions, at lower P_i concentration (1 mM), cyclosporin A caused an almost complete protection (line a) against membrane permeabilization. The dashed line represents a control experiment in the absence of added phosphate. In this regard, Fig. 2A shows that

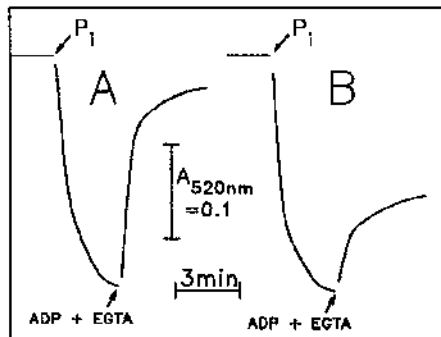


FIG. 2. Recovery of mitochondrial swelling by addition of EGTA and ADP. RLM (0.4 mg/ml) were incubated in reaction medium in the absence of sucrose (130 mM KCl, 10 mM Hepes buffer, pH 7.2, 5.0 μM rotenone, 2 mM succinate, and 10 μM Ca^{2+}). P_i (1 mM in panel A, 4 mM in panel B) was added after 2 min of mitochondrial preincubation. EGTA (1 mM) and 200 μM ADP were added where indicated.

the mitochondrial swelling induced by 1 mM P_i observed in Fig. 1B could be reversed almost completely by the addition of EGTA plus ADP, when mitochondria were incubated in a sucrose-free medium. This finding is compatible with membrane resealing (MTP closure), followed by extrusion of the osmotic support that penetrated before addition of EGTA and ADP. At variance with the conditions above, mitochondrial swelling induced by 4 mM P_i was only partially reversed by EGTA and ADP (Fig. 2B), as would be expected if, under these conditions, the membrane permeabilization was caused by both MTP opening and lipid peroxidation.

In order to confirm the occurrence of lipid peroxidation during the mitochondrial swelling induced by high P_i concentrations, the production of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) was measured. Table I shows that TBARS production by mitochondria incubated in the presence of P_i increases with increasing P_i concentrations. This production was greatly diminished when catalase, EGTA, BHT, or sorbate were present. Accordingly, arsenate, a phosphate analog, was also able to cause a great stimulation of TBARS production. In contrast, acetate, which like P_i or arsenate stimulates Ca^{2+} accumulation by mitochondria by preventing matrix alkalization and elimination of membrane potential (33), had a much lower effect on lipid peroxidation.

Regarding the stimulation of lipid peroxidation by P_i , Fig. 3A demonstrates that mitochondrial swelling induced by 4 mM P_i (line d) can be significantly inhibited by sorbate (line b), a putative quencher of triplet carbonyl species (26). This inhibition is enhanced by the simultaneous presence of cyclosporin A (line a), but not of BHT (line c). This suggests that sorbate inhibits only the component of membrane permeabilization related to lipid peroxidation and not by MTP opening. Indeed, Fig. 3B shows that sorbate was not capable of inhibiting swelling induced by 1 mM P_i (line a).

In a previous report we have demonstrated that reduced coenzyme Q is the site for electron leakage responsible for Ca^{2+} -induced ROS production in liver mitochondria (20). In order to ascertain the proposition that mitochondrial damage induced by Ca^{2+} plus P_i is mediated by mitochondrial generated ROS at the level of coenzyme Q, we performed experiments with carbonyl cyanide *p*-trifluorophenylhydrazone-deenergized mitochondria treated with antimycin A in the presence or absence of succinate, which maintains coenzyme Q in the reduced or oxidized form, respectively (18). Fig. 4 shows that in the absence of succinate, a condition under which H_2O_2 production is minimum (20), 4 mM P_i addition did not cause mitochondrial swelling (line a), while in the presence of succinate,

TABLE I
TBARS formation by mitochondrial preparations in the presence of Ca^{2+} plus P_i or arsenate

The experimental conditions were similar to those of Fig. 1.

Conditions	TBARS formation
A. Effect of P_i concentration, arsenate, or acetate (in presence of 10 μM Ca^{2+})	
nmol TBARS/mg protein/10 min	
No additions	0.30 $\pm$ 0.01 ^a
1 mM EGTA	0.16 $\pm$ 0.04
1 mM P_i	0.93 $\pm$ 0.03
2 mM P_i	1.91 $\pm$ 0.01
3 mM P_i	2.24 $\pm$ 0.05
4 mM P_i	2.48 $\pm$ 0.07
5 mM P_i	2.67 $\pm$ 0.02
2.5 mM arsenate	2.59 $\pm$ 0.05
20 mM acetate	0.91 $\pm$ 0.03
B. Effect of EGTA, catalase, BHT, or sorbate on 4 mM P_i plus 10 μM Ca^{2+} induced TBARS formation	
nmol TBARS/mg protein/10 min	
1 mM EGTA	1.10 $\pm$ 0.03
2 μM catalase	1.14 $\pm$ 0.05
5 μM BHT	1.12 $\pm$ 0.03
100 μM sorbate	1.15 $\pm$ 0.01

^a Values represent averages of six different experiments $\pm$ S.D.

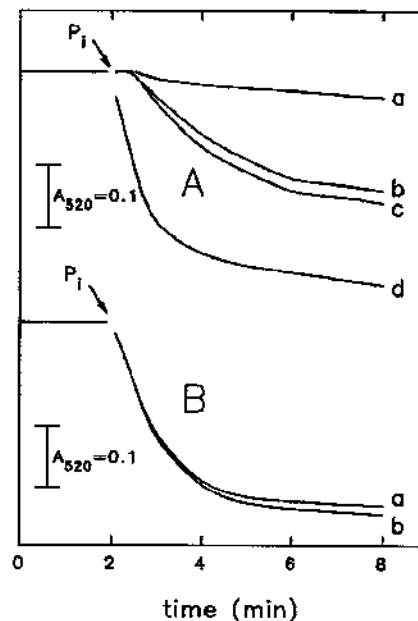


FIG. 3. Effect of sorbate on mitochondrial swelling induced by P_i and Ca^{2+} . RLM (0.4 mg/ml) were added to standard reaction medium, containing the following: panel A: a, 100 μM sorbate and 1 μM cyclosporin A; b, 100 μM sorbate; c, 100 μM sorbate and 5 μM BHT; d, no additions; panel B: a, 100 μM sorbate; b, no additions. P_i (4 mM in panel A, 1 mM in panel B) was added after 2 min of mitochondrial preincubation.

which increases electron leakage at the level of coenzyme Q (18, 20), a fast and extensive swelling was observed (line d). This swelling was partially inhibited by 100 μM sorbate (line b) or 5 μM BHT (line c) indicating that there is a component of membrane permeabilization related to lipid peroxidation. In addition, Fig. 5 shows that additions of arsenate (line a) or P_i (lines b and c), but not acetate (line d), greatly stimulate the mitochondrial production of H_2O_2 caused by Ca^{2+} alone (line e).

The nature of the synergism between P_i and Ca^{2+} in the process of lipid peroxidation was assessed by using a model system consisting of PC/DCP liposomes and the well known

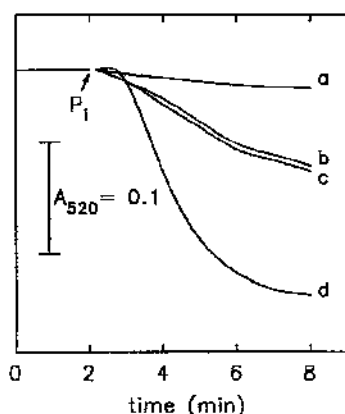


FIG. 4. Effect of coenzyme Q redox state on mitochondrial swelling induced by Ca^{2+} and P_i . RLM (0.4 mg/ml) were incubated in reaction medium (125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM Hepes buffer, pH 7.2, 5.0 μM rotenone, 2 μM antimycin A, 1 μM carbonyl cyanide *p*-trifluorophenylhydrazone, and 300 μM Ca^{2+}) containing: a, no additions; b, 2 mM succinate plus 100 μM sorbate; c, 2 mM succinate plus 5 μM BHT; d, 2 mM succinate. P_i (4 mM) was added where indicated.

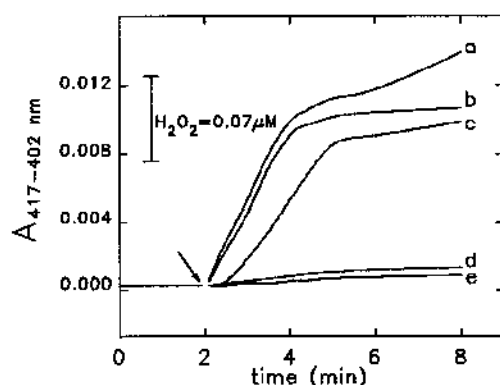
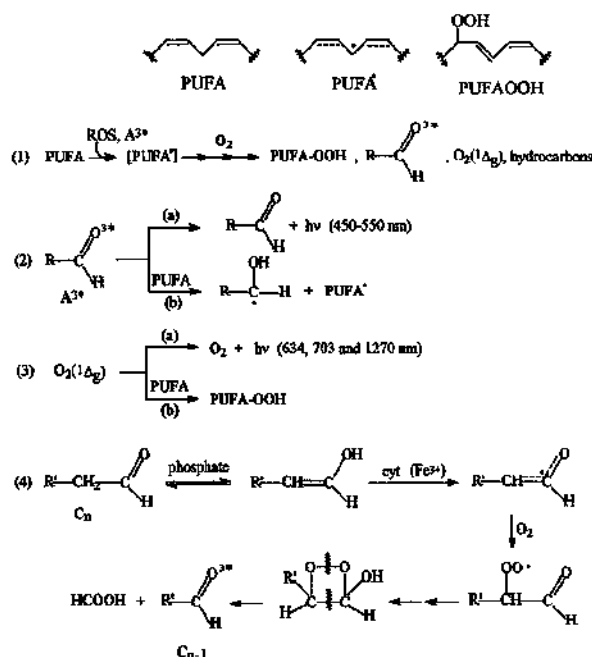


FIG. 5. Production of H_2O_2 induced by P_i , arsenate, or acetate additions to Ca^{2+} -loaded mitochondria. RLM (0.3 mg/ml) were added to standard reaction medium containing 1 μM horseradish peroxidase, 1 μM cyclosporin A, and 5 μM BHT. Where indicated by the arrow, 2.5 mM arsenate (a), 4 mM P_i (b), 1 mM P_i (c), or 20 mM acetate (d) was added. Line e represents a control experiment with no additions.

triplet acetone-generating system HRP/IBAL (26); DCP confers negative charge to the liposomes. It is well established that triplet acetone can abstract an allylic electron from linolenic and arachidonic acid (see Scheme II, Reaction 2b) (25), initiating their peroxidation. We hypothesized that: (i) whichever the mechanism, the interaction of P_i with the membrane lipid phase would be facilitated by neutralization of the membrane surface negative charge by Ca^{2+} ; and (ii) the phosphate property to catalyze the enolization of aldehyde lipid peroxidation products (25) would favor their further α -peroxidation yielding extra triplet carbonyls (Reaction 4), thus increasing the rate of polyunsaturated fatty acid peroxidation (Reaction 2b). Indeed, Fig. 6 shows that P_i stimulated lipid peroxidation (as judged by TBARS absorbance increase at 535 nm) in this model system, in a dose-dependent fashion, when a constant Ca^{2+} concentration (0.5 mM) was present (squares). It should be mentioned that in the absence of Ca^{2+} the rate of TBARS production (during 10 min) was 50% smaller at a P_i concentration of 5 mM (not shown). This supports the hypothesis that the P_i effect is potentiated by the electrostatic interaction between Ca^{2+} and DCP. This is well documented by Fig. 6 (circles) showing that this physical effect of Ca^{2+} , under constant P_i concentration, increases by increasing its concentration from zero to 1 mM. In



SCHEME II. Chain length amplification of polyunsaturated fatty acid peroxidation by triplet carbonyl products. Peroxidation of PUFA is initiated by either $\text{HO}^\bullet$ radicals or triplet carbonyls (A^{3*}) to give hydroperoxides (PUFA-OOH) and fragmentation products, which include triplet aldehydes, singlet oxygen and short hydrocarbons (Reaction 1). The chain propagation of PUFA peroxidation can thus be amplified (Reaction 2b) by A^{3*} . The typical chemiluminescence which accompanies the process is attributed to radiative deactivation of the triplet products (Reaction 2a) and singlet oxygen (Reaction 3a). Singlet oxygen can also undergo 1,3-cycloaddition to PUFA to yield PUFA-OOH (Reaction 3b). In the presence of phosphate and cytochrome *c* (cyt Fe^{2+}), the peroxidation-generated aldehydes can behave similarly to the isobutanol/HRP system (Scheme I) producing lower aldehydes homologous in the triplet state (Reaction 4), which are able to reinitiate the peroxidation cycle (Reaction 1).

contrast, when phosphate (5 mM) was replaced by Tris at the same concentration, TBARS production was negligible and Ca^{2+} had no effect (data not shown). The saturation kinetics displayed by both experiments in Fig. 6 may be rationalized in terms of the liposome concentration being limitant to the peroxidative process.

DISCUSSION

Previous results (17–19) from our laboratory show that mitochondrial membrane permeabilization induced by Ca^{2+} , under conditions of oxidative stress associated with *t*-butyl hydroperoxide reduction, is mediated by the oxidative attack of reactive oxygen species to membrane protein thiols. This causes thiol cross-linkage and high molecular weight protein aggregate production that may open a membrane pore upon the binding of Ca^{2+} (34). These alterations of the inner mitochondrial membrane seem to be related to the state designated as mitochondrial membrane permeability transition, characterized by the reversible opening of a membrane protein pore. The current understanding is that MTP is a protein channel (for review, see Refs. 9 and 10) that is opened by low membrane potential (32, 35), thiol cross-linking agents (34, 36), and various inducing agents in the presence of Ca^{2+} and closed by EGTA, ADP, Mg^{2+} (37), sulfhydryl reducing agents (21, 36), protonation of the mitochondrial matrix (32), and submicromolar concentrations of cyclosporin A (30).

This work provides evidence that in the presence of P_i the increase in membrane permeability caused by Ca^{2+} can be mediated by alterations of both proteins and lipids. The rela-

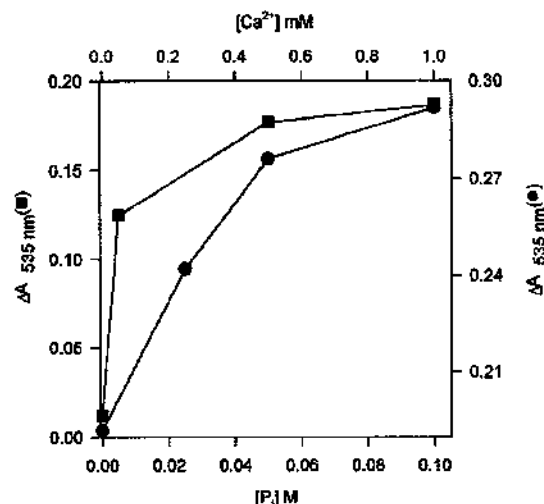


FIG. 6. Enhancement of lipid peroxidation by P_i and Ca^{2+} in the model system consisting of PC/DCP 20 mol% liposomes. Lipid peroxidation was initiated by the triplet acetone-generating system HRP (5 μM)/IBAL (1 mM). PC/DCP liposomes typically contained [PC + DCP] $\sim$ 3.5 mM. The vesicles were incubated with the HRP/IBAL system at 37 $^{\circ}\text{C}$ during 20 min, and then samples were taken for TBARS determination, as described under "Materials and Methods." Squares represent the effect of P_i concentration in the presence of 0.5 mM Ca^{2+} . Circles represent the effect of Ca^{2+} concentration in the presence of 5 mM P_i .

tive importance of these processes depends on P_i concentration. At high P_i concentrations, both lipid peroxidation and MTP opening occur. This is illustrated in Fig. 1A by the partial protection conferred either by cyclosporin A or BHT and the total protection obtained when both compounds were present simultaneously. However, at lower P_i concentrations, opening of the MTP appears to be the main alteration, since cyclosporin A alone provides an almost complete mitochondrial protection (Fig. 1B).

The role of P_i seems to be mediated by a stimulation of mitochondrial ROS production at the level of reduced coenzyme Q, since maintenance of this coenzyme in an oxidized state prevents H_2O_2 production and mitochondrial swelling (see Fig. 4). Indeed, Kowaltowski *et al.*² provided evidence that, as in the case of *t*-butyl hydroperoxide plus Ca^{2+} (19), P_i plus Ca^{2+} did not cause membrane permeabilization when mitochondria were incubated in the absence of O_2 . The mechanism by which P_i increases H_2O_2 production is still unknown but requires the presence of matrix Ca^{2+} . The experiments carried out with liposomes (Fig. 6) support the notion that Ca^{2+} binding to inner membrane surface (cardiolipins) decreases negative surface charge density (38) easing the access of P_i to the membrane lipid phase where it may stimulate lipid peroxidation (see Scheme II). This may render the respiratory chain more susceptible to electron leakage and ROS production.

With reference to the mechanisms by which P_i or arsenate stimulate lipid peroxidation, it is important to recall their property to catalyze tautomerization of aldehydes (C_n) (25), a process that may be followed by cytochrome-catalyzed peroxidation of the enols formed (Ref. 39 and Scheme II, Reaction 4). This leads to increased production of the C_{n-1} aldehyde in the triplet state (triplet carbonyls), which stimulates lipid peroxidation (Scheme II, Reaction 2b). Lipid peroxidation is a chemiluminescent process, due to the production of triplet carbonyls and singlet oxygen (Scheme II, Reactions 2a and 3a) (40–42).

Triplet carbonyls (Scheme II, Reaction 2b) can initiate the peroxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) (25) and singlet oxygen (Scheme II, Reaction 3b) directly produces the final product (PUFA-OOH) by 1,3-cycloaddition (42). This would amplify the propagation length of the peroxidative reaction chain. The stimulation by P_i of triplet carbonyl formation is strongly supported by the observed inhibitory effect of sorbate, a triplet carbonyl quencher, on both TBARS yield and mitochondrial swelling. Sorbate has been shown to quench triplet acetone formed by the IBAL/HRP system at the micromolar range (26). Regarding the participation of cytochromes in this process, recent results from our laboratory (39) reveal that mitochondria have the ability to promote a cytochrome-mediated P_i -stimulated oxidation of diphenylacetaldehyde. This oxidation produces triplet benzophenone and is followed by a BHT-sensitive process of membrane permeabilization.

In addition, the data presented in this paper is relevant regarding the discrimination of factors determining reversibility versus irreversibility of Ca^{2+} -induced cell injury under conditions of ischemia and reperfusion. Although membrane permeabilization determined by MTP opening, in studies *in vitro*, is easily reversed by pore closure induced by EGTA, disulfide reductants, cyclosporin A, adenine nucleotides, etc. (9) under *in vivo* conditions, in which phosphate concentrations attain high levels, overlapping of the peroxidative process seems to be an important event leading to irreversible or lethal cell injury.

Acknowledgments—We thank Luis H. G. Ribeiro and Matheus P. C. Vercesi for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Reed, D. J. (1990) *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 495–502
- Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G., and Nicotera, P. (1990) *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 281–285
- McCord, J. M. (1985) *N. Engl. J. Med.* **312**, 159–163
- Poole-Wilson, P. A., Harding, D. P., Bourdillon, P. D., and Tones, M. A. (1984) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **16**, 175–185
- Halliwel, B., and Gutteridge, J. M. (1985) *Mol. Aspects Med.* **8**, 89–193
- Kammermeier, H., Schmidt, P., and Jungling, E. (1982) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **14**, 267–277
- Paller, M. S., and Greene, E. L. (1994) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **723**, 59–70
- Lange, L. G., Hartman, M., and Sobel, B. E. (1984) *J. Clin. Invest.* **73**, 1046–1052
- Gunter, T. E., and Pfeiffer, D. R. (1990) *Am. J. Physiol.* **258**, C755–C786
- Zoratti, M., and Szabo, I. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 139–176
- Crompton, M., and Costi, A. (1988) *Eur. J. Biochem.* **178**, 489–501
- Haworth, R. A., and Hunter, D. R. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **195**, 460–467
- Riley, W. W., Jr., and Pfeiffer, D. R. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14018–14024
- Carbonera, D., and Azzone, G. F. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **943**, 245–255
- Vercesi, A. E., Ferraz, V. L., Macedo, D. V., and Fiskum, G. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 934–941
- Nepomuceno, M. F., Macedo, D. V., and Pereira-da-Silva, L. (1991) *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **24**, 833–836
- Valle, V. G. R., Fagiani, M. M., Parentoni, L. S., Meinicke, A. R., and Vercesi, A. E. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 1–7
- Castilho, R. F., Kowaltowski, A. J., Meinicke, A. R., and Vercesi, A. E. (1995) *Free Radical Biol. Med.* **18**, 55–59
- Castilho, R. F., Kowaltowski, A. J., Meinicke, A. R., Bechara, E. J. H., and Vercesi, A. E. (1995) *Free Radical Biol. Med.* **18**, 479–486
- Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (1995) *Am. J. Physiol.* **269**, C141–C147
- Fagiani, M. M., Pereira-da-Silva, L., Martins, I. S., and Vercesi, A. E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19955–19960
- Beatrice, M. C., Stiers, D. L., and Pfeiffer, D. R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1279–1287
- Castilho, R. F., Meinicke, A. R., Almeida, A. M., Hermes-Lima, M., and Vercesi, A. E. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 158–163
- Hermes-Lima, M., Castilho, R. F., Meinicke, A. R., and Vercesi, A. E. (1995) *Mol. Cell. Biochem.* **145**, 53–60
- Indig, G., Campa, A., Bechara, E. J. H., and Cilenio, G. (1988) *Photochem. Photobiol.* **48**, 719–723
- Bechara, E. J. H., Faria-Oliveira, O. M. M., Durán, N., Batista, R. C., and Cilenio, G. (1979) *Photochem. Photobiol.* **30**, 101–110
- Mortara, R. A., Quina, F. H., and Chaimovich, H. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 1080–1086
- Cadenas, E., and Boveris, A. (1980) *Biochem. J.* **188**, 31–37
- Buege, J. A., and Aust, S. D. (1978) *Methods Enzymol.* **52**, 302–310
- Crompton, M., Ellinger, H., and Costi, A. (1983) *Biochem. J.* **255**, 357–360
- Novgorodov, S. A., Gudiz, T. I., Kushnareva, Y. E., Zorov, D. B., and Kudrjashov, Y. B. (1990) *FEBS Lett.* **277**, 123–126

² A. J. Kowaltowski, R. F. Castilho, and A. E. Vercesi, unpublished data.

32. Bernardi, P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 8834–8839
33. Antonio, R. V., Pereira-da-Silva, L., and Vercesi, A. E. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 250–258
34. Bernardes, C. F., Meyer-Fernandes, J. R., Basseres, D. S., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1188**, 93–100
35. Bernardi, P., Veronese, P., and Petronilli, V. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 1005–1010
36. Petronilli, V., Constantini, P., Scorrano, L., Colonna, R., Passamonti, S., and Bernardi, P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16638–16642
37. Novgorodov, S. A., Gudiz, T. I., Brickey, G. P., and Pfeiffer, D. R. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 219–228
38. Hiemenz, P. C. (1986) *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 2nd Ed., pp. 677–730, Marcel Dekker, Inc., New York
39. Nantes, I. L., Cilento, G., Bechara, E. J. H., and Vercesi, A. E. (1995) *Photochem. Photobiol.* **62**, 522–527
40. Lissi, E. A., Cáceres, T., and Videla, L. A. (1988) *Free Radical Biol. Med.* **4**, 93–97
41. Cadenas, E. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 79–110
42. Di Mascio, P., Catalani, L. H., and Bechara, E. J. H. (1992) *Free Radical Biol. Med.* **12**, 471–478

3.1.3. Discussão do 1º Trabalho

Na figura 1 deste trabalho, comprovamos que a adição de P_i 4 mM a uma suspensão de mitocôndrias incubada na presença de Ca^{2+} leva a uma diminuição significativa da absorbância da suspensão mitocondrial, devido ao inchamento da organela. Isso confirma resultados anteriores que demonstravam a ocorrência de permeabilização mitocondrial não seletiva na presença de Ca^{2+} e P_i (ROSSI & LEHNINGER, 1964; ZORATTI & SZABÒ, 1995; KOWALTOWSKI *et al.*, 1996). No entanto, apesar da maioria desses trabalhos atribuir essa permeabilização mitocondrial à TPM, nós comprovamos que a permeabilização mitocondrial nessas condições era apenas parcialmente prevenida por ciclosporina A, um inibidor específico da TPM. A permeabilização mitocondrial nessas condições só era totalmente inibida por ciclosporina A quando induzida por uma concentração menor (1 mM) de P_i .

A proteção parcial promovida por ciclosporina na presença de altas concentrações de P_i sugere que, além da TPM, a permeabilização mitocondrial nessas condições envolve outro processo de alteração da membrana mitocondrial interna. Sabendo que a peroxidação lipídica também é capaz de promover alterações de permeabilidade da membrana mitocondrial (CASTILHO *et al.*, 1994; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999), testamos o efeito de um inibidor de peroxidação lipídica, o butil hidroxitolueno. A observação de que o butil hidroxitolueno inibe parcialmente a permeabilização mitocondrial induzida por P_i 4 mM, de forma aditiva com a ciclosporina A, fortemente sugere que a permeabilização mitocondrial nessas condições envolve um processo de TPM associada à lipoperoxidação. Essa hipótese é confirmada pelos experimentos subsequentes, demonstrando que (i) a

reversibilidade induzida por ADP e EGTA ao inchamento mitocondrial na presença de P_i 4 mM é bastante diminuída em relação àquela observada na presença de P_i 1 mM, demonstrando que a TPM induzida pelo P_i 4 mM é acompanhado de um processo de permeabilização mitocondrial irreversível (Fig. 2) e (ii) há uma formação aumentada de produtos reativos do ácido tiobarbitúrico, consequência de peroxidação lipídica, na presença de concentrações crescentes de P_i (Tabela I).

O mecanismo pelo qual o P_i estimula a lipoperoxidação mitocondrial é sugerido pelo experimento mostrado na Fig. 3. Aqui, verificamos que a permeabilização mitocondrial induzida por Ca^{2+} e P_i pode ser parcialmente inibida por sorbato, um seqüestrador de espécies tripletes (AUGUSTO & BECHARA, 1980), de modo não aditivo com o butil hidroxitolueno. Isso sugere que o P_i pode aumentar a presença de espécies tripletes na mitocôndria, estimulando assim a lipoperoxidação da membrana mitocondrial interna. Um modelo esquemático de como o P_i pode levar ao acúmulo de espécies tripletes, elaborado com o auxílio do Dr. Etelvino J.H. Bechara, está mostrado no Esquema II desse 1º trabalho. Aqui, propomos que o P_i catalizaria a enolização de produtos da oxidação de aldeídos, que, na presença de citocromo *c* mitocondrial, gerariam aldeídos no estado triplete, capazes de propagar reações de peroxidação lipídica. Essa hipótese é suportada por experimentos conduzidos pela Dra. Mercedes T. Grijalba, demonstrando que o Ca^{2+} e P_i aumentam a peroxidação lipídica em um sistema modelo formado por lipossomos contendo dicetilfosfato (Fig. 6).

Outra observação importante do presente trabalho é a capacidade da catalase inibir a permeabilização mitocondrial induzida por Ca^{2+} e P_i (Fig. 1). Isso sugere que a permeabilização mitocondrial induzida por Ca^{2+} e P_i , assim como aquela promovida por

Ca^{2+} e prooxidantes (VALLE *et al.*, 1993; CASTILHO *et al.*, 1994), é causada por EROs geradas pela cadeia respiratória mitocondrial. Apesar do P_i não ter propriedades químicas de um prooxidante, comprovamos que a adição de P_i a uma suspensão mitocondrial promove um aumento significativo na geração mitocondrial de EROs (Fig. 5), que seria o mecanismo pelo qual o P_i promove a permeabilização mitocondrial observada. Comprovando essa hipótese, a permeabilização mitocondrial na presença de rotenona é dependente da presença de succinato (Fig. 4), necessário para a geração mitocondrial de EROs ao nível da coenzima Q (KOWALTOWSKI *et al.*, 1995; veja item 1.2.).

Em resumo, o trabalho demonstra que a permeabilização mitocondrial induzida por Ca^{2+} e P_i é causada por EROs geradas pela mitocôndria, e pode ser secundária à TPM isoladamente, na presença de baixas concentrações de P_i , ou à TPM associada à lipoperoxidação, na presença de altas concentrações de P_i .

3.2. - 2º Trabalho

KOWALTOWSKI, A.J., NETTO, L.E.S. E VERCESI, A.E. The Thiol-specific Antioxidant Enzyme Prevents Mitochondrial Permeability Transition: Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. **J. Biol. Chem.** 273: 12766-12769, 1998.

3.2.1. Introdução ao 2º Trabalho

Com os dados obtidos no 1º trabalho, pudemos comprovar que a TPM induzida por Ca^{2+} na presença de baixas concentrações de P_i era precedida por um aumento na geração mitocondrial de EROs e inibida por catalase. Os resultados apresentados neste 2º trabalho expandem esses estudos, e demonstram que o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e P_i pode também ser inibido por outros compostos com atividades peroxidásica, como a tioredoxina peroxidase (conhecida também antioxidante específico para tióis) e o ebselen.

Demonstramos também que a inibição ao inchamento mitocondrial promovido por catalase, tioredoxina peroxidase e ebselen é acompanhada de uma prevenção à oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial que ocorre na presença de Ca^{2+} e P_i . A determinação de tióis protéicos foi realizada através do uso de DTNB, um indicador colorimétrico de tióis reduzidos. A prevenção à oxidação de tióis se deve à remoção por esses compostos de H_2O_2 gerado pela mitocôndria tratada com Ca^{2+} e P_i .

Esse 2º trabalho apresenta ainda evidências de que a TPM induzida por Ca^{2+} e P_i é inibida pela diminuição progressiva do oxigênio no meio de reação em que a mitocôndria é incubada. Essa é ainda mais uma evidência de que a TPM induzida por Ca^{2+} e P_i é dependente de EROs geradas pela mitocôndria.

2º Trabalho

3.2.2. THE THIOL-SPECIFIC ANTIOXIDANT ENZYME PREVENTS MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION: EVIDENCE FOR THE PARTICIPATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THIS MECHANISM.

The Thiol-specific Antioxidant Enzyme Prevents Mitochondrial Permeability Transition

EVIDENCE FOR THE PARTICIPATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THIS MECHANISM*

(Received for publication, December 29, 1997, and in revised form, March 11, 1998)

Alicia J. Kowaltowski[‡], Luis E. S. Netto[§], and Anibal E. Vercesi[‡]

From the [‡]Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil and [§]Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil

Mitochondrial swelling and membrane protein thiol oxidation associated with mitochondrial permeability transition induced by Ca^{2+} and inorganic phosphate are inhibited in a dose-dependent manner either by catalase, the thiol-specific antioxidant enzyme (TSA), a protein recently demonstrated to present thiol peroxidase activity, or ebselen, a selenium-containing heterocycle which also possesses thiol peroxidase activity. This inhibition of mitochondrial permeability transition is due to the removal of mitochondrial-generated H_2O_2 which can easily diffuse to the extramitochondrial space. Whereas ebselen required the presence of reduced glutathione as a reductant to grant its protective effect, TSA was fully reduced by mitochondrial components. Decrease in the oxygen concentration of the reaction medium also inhibits mitochondrial permeabilization and membrane protein thiol oxidation, in a concentration-dependent manner. The results presented in this report confirm that mitochondrial permeability transition induced by Ca^{2+} and inorganic phosphate is reactive oxygen species-dependent. The possible importance of TSA as an intracellular antioxidant, avoiding the onset of mitochondrial permeability transition, is discussed in the text.

It is well known that mitochondria may lose their ability to phosphorylate ADP, suffer decrease in membrane potential, and begin to swell when incubated in the presence of Ca^{2+} ions. This Ca^{2+} -dependent, nonspecific inner mitochondrial membrane permeabilization was named mitochondrial permeability transition (MPT)¹ and was found to be inhibited by the immune suppressor cyclosporin A (for reviews, see Refs. 1 and 2).

Ca^{2+} -induced mitochondrial permeability transition (MPT) can be stimulated by a wide variety of compounds with different chemical characteristics, known as inducers, including inorganic phosphate (P_i), oxidizing agents, dithiol reagents, protonophores, and ligands of the adenine nucleotide translocator (for a list see Ref. 2), although inorganic phosphate is the most probable MPT inducer *in vivo*. The observation that MPT was stimulated by prooxidants (2, 3) first led us to the hypothesis

that MPT could be caused by reactive oxygen species (ROS) produced by the mitochondrial respiratory chain (4–6). This hypothesis was confirmed by studies showing that MPT induced by prooxidants could be prevented by the presence of catalase (5, 7), *o*-phenanthroline (5), or the absence of oxygen (5). Further studies demonstrated that MPT induced by P_i and protonophores was also ROS-dependent (8, 9). Mitochondria-generated ROS promote the oxidation and cross-linkage of mitochondrial membrane protein thiol groups, leading to MPT (5, 6, 10, 11). Despite extensive evidence (for review see Ref. 4), recently the hypothesis that MPT is ROS-dependent has been questioned (12).

The role of MPT is still unknown, but evidence is accumulating that MPT may be an initial event in the process of cell death which occurs in a variety of pathological states, such as ischemia/reperfusion (13, 14). Many studies have also proposed that MPT may be an initial step of apoptosis (15, 16). In this regard, Kroemer and co-authors (15) have recently demonstrated that mitochondrial swelling due to MPT leads to the release of a 50-kDa protein, the “apoptosis inducing factor,” from the intermembrane space into the cytosol. This protein, when isolated, causes apoptotic changes in isolated nuclei (15). Based on these results, Skulachev (16) formulated the hypothesis that ROS-producing mitochondria suffer MPT, leading to release of the apoptosis inducing factor. If the number of ROS-producing mitochondria is large, sufficient quantities of the apoptosis inducing factor accumulate, leading to cell death. Thus, MPT would be a mechanism for eliminating cells which have high ROS generation (16).

The thiol-specific antioxidant enzyme (TSA), also known as thioredoxin peroxidase, is a new antioxidant enzyme originally isolated from yeast and later found in mammalian tissues (17, 18). This protein has the ability to protect biomolecules from oxidative damage if a thiol reductant such as dithiothreitol (DTT) or thioredoxin is present (17, 19). Recently, the antioxidant property of TSA was attributed to its thiol peroxidase activity as follows: $2 \text{ RSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{RSSR} + 2 \text{ H}_2\text{O}$ (20). Because proteins belonging to the TSA family are usually present in large quantities in protozoan, yeast, and mammalian cells (21–24), we questioned whether this antioxidant protein may play an important role in defense against MPT. The results presented in this paper were designed to investigate both if TSA is capable of inhibiting mitochondrial permeabilization associated with MPT and if the inhibition of MPT by peroxidases is strictly related to their H_2O_2 removal activity. The effect of ebselen, a selenium-containing heterocycle and analogue of glutathione peroxidase, which presents peroxidase, but not free-radical scavenging activity (25), was also studied.

* This work was partially supported by grants from the Brazilian Agencies FAPESP, FAEP-UNICAMP, and CNPq-PADCT. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ The abbreviations used are: MPT, mitochondrial permeability transition; P_i , inorganic phosphate; ROS, reactive oxygen species; TSA, thiol-specific antioxidant enzyme; C47S, yeast TSA mutant protein, where cysteine 47 was replaced by a serine residue; C170S, yeast TSA mutant protein, where cysteine 170 was replaced by a serine residue; DTT, dithiothreitol.

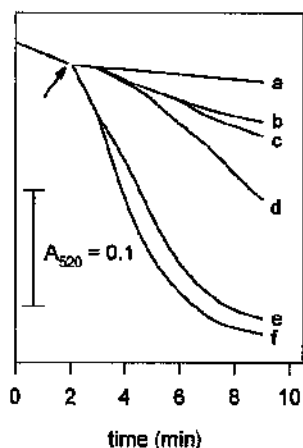


FIG. 1. Effect of TSA and catalase on mitochondrial swelling induced by Ca^{2+} and P_i . Rat liver mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated in standard reaction medium in the presence of 100 μM EGTA or 1 μM cyclosporin A (line a), 16 μM TSA (line b), 2 μM catalase (line c), 16 μM C170S (line d), no further additions (line e), or 16 μM C47S (line f). P_i (0.5 mM) was added where indicated by the arrow.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Standard Incubation Procedure.—Mitochondria were isolated as described in Refs. 5 and 6 and incubated at 28 $^{\circ}\text{C}$ in a standard reaction medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM Hepes buffer, pH 7.2, 10 μM CaCl_2 , 2 mM succinate, and 4 μM rotenone. Other additions are indicated in the figure legends. The results shown are representative of a series of at least three experiments.

Determination of Mitochondrial Swelling.—Mitochondrial swelling was estimated from the decrease in the absorbance at 520 nm measured by a SLM Aminco DW2000 spectrophotometer (SLM Instruments, Inc., Urbana, IL).

Determination of Protein Thiol Groups Content.—Mitochondrial membrane thiol groups were determined using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (Ellman's reagent) as described in Refs. 11 and 26. In control conditions, mitochondrial membrane protein thiol content was approximately 45 nmol/mg protein and was reduced to approximately 30 nmol/mg protein after treatment with Ca^{2+} and P_i .

Determination of Mitochondrial H_2O_2 Generation.— H_2O_2 production was assessed by the oxidation of scopoletin by horseradish peroxidase in the presence of H_2O_2 (27). Scopoletin fluorescence was monitored at excitation and emission wavelengths of, respectively, 365 and 450 nm, on a Hitachi F-4010 fluorimeter. Calibration was performed by adding known quantities of H_2O_2 . In these determinations, citrate was used as a Ca^{2+} chelator, because the presence of EGTA interferes with scopoletin fluorescence. Cyclosporin A was present in all determinations in order to prevent artifacts due to mitochondrial swelling.

Oxygen Uptake Measurements.—Oxygen concentration was measured using a Clarke-type electrode (Yellow Springs Instruments Co.) in a glass cuvette equipped with magnetic stirring.

Materials.—Antimycin A, catalase (C-10), horseradish peroxidase (type IV-A), ebselen, reduced glutathione, cyclosporin A, EGTA, Hepes, rotenone, and succinate were obtained from Sigma. All other reagents were commercial products of the highest purity grade available. Yeast TSA has two highly conserved cysteine residues (Cys-47 and Cys-170) (18). The wild-type and mutant proteins C47S and C170S, where the respective cysteine residues were replaced by serine, were purified as described previously (28).

RESULTS AND DISCUSSION

The hypothesis that MPT is dependent on the presence of mitochondria-generated ROS (for review, see Ref. 4) is further supported by the results presented in Fig. 1, showing that mitochondrial swelling associated with MPT induced by Ca^{2+} and P_i (line e) was prevented by the presence of 16 μM thiol-specific antioxidant enzyme (TSA, line b). This inhibition was similar to that observed in the presence of 2 μM catalase (line c). Similar results were also obtained using MER-5 (results not shown), a mammalian mitochondrial isoform of TSA that is 58% identical to the yeast protein (28). However, we chose to

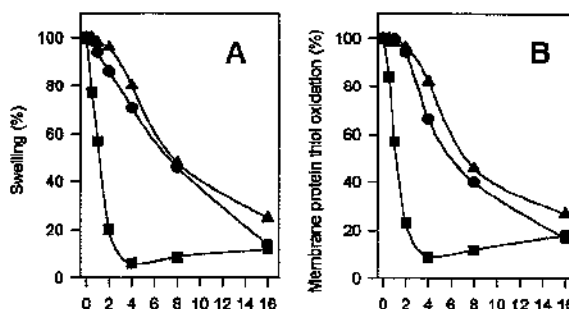


FIG. 2. Effect of catalase (■), TSA (●), and ebselen (▲) on mitochondrial swelling (A) and membrane protein thiol oxidation (B) induced by Ca^{2+} and P_i . Rat liver mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated for 10 min in standard reaction medium containing catalase (■), TSA (●), or ebselen, in the presence of 2 μM reduced glutathione (▲), in the concentrations indicated. P_i (0.5 mM) was added after 2 min incubation. Percentages of swelling extent and protein thiol oxidation were calculated as proportions of total mitochondrial swelling extent and protein thiol oxidation, obtained in the absence of catalase, TSA, or ebselen.

use yeast TSA in this investigation due to the ready availability of site-specific mutant forms. C47S, a mutant form of TSA devoid of thiol peroxidase activity (see "Experimental Procedures" and Refs. 20 and 28), did not show an inhibitory effect on mitochondrial permeabilization (line f), demonstrating that the protective effect of TSA on mitochondrial swelling is not due to a nonspecific protein effect. The full inhibition of the mitochondrial swelling obtained in the presence of cyclosporin A (line a) confirms that the permeabilization is due to MPT (2).

In cell-free systems, the peroxidase activity of TSA is dependent on the addition of a thiol reductant such as thioredoxin or DTT (20). Since in our experiments TSA was added in its oxidized form, it is safe to assume that it is reduced by components of the mitochondrial suspension, possibly thioredoxin, reduced glutathione, or even outer membrane protein thiol groups. Indeed, thioredoxin, a 12.5-kDa protein containing two vicinal cysteines, has been considered the physiological substrate for TSA (19). C170S is a site-specific mutant of TSA that is active in the presence of low molecular weight thiols such as DTT but is inactive when thioredoxin is used as electron donor (see "Experimental Procedures" and Refs. 19 and 20). C170S promoted partial inhibition of MPT induced by Ca^{2+} and P_i (line d), indicating that mitochondrial thioredoxin is at least partially responsible for the reduction of TSA. Although TSA seems to have higher affinity for thioredoxin (19), this antioxidant protein is also reduced by other thiol compounds (17, 20). Since mitochondrial suspensions are rich in reduced thiols, such as outer membrane protein thiol groups, it is reasonable to assume that these reductants can also donate electrons to TSA. Indeed, the addition of thioredoxin to the mitochondrial suspension did not stimulate the effect of TSA (results not shown), indicating that TSA is fully reduced by mitochondrial components.

A comparison between the effects of TSA, catalase, and ebselen, a selenium-containing heterocyclic compound that exhibits peroxidase-like activity (for review, see Ref. 25), on mitochondrial swelling and membrane protein thiol oxidation induced by Ca^{2+} and P_i is shown in Fig. 2. We observed that catalase (■) and TSA (●) inhibit mitochondrial swelling and membrane protein thiol oxidation in a dose-dependent manner, although TSA requires concentrations 6–8 times higher than catalase to present the same effect. This is in agreement with the hydrogen peroxide removal activities of these antioxidant proteins (20). Ebselen (▲) also presented an inhibitory effect on mitochondrial swelling and membrane protein thiol oxidation

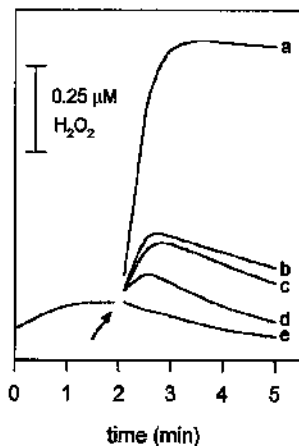


FIG. 3. Effect of TSA, catalase, and ebselen on mitochondrial H_2O_2 generation stimulated by Ca^{2+} and P_i . Rat liver mitochondria (1.0 mg/ml) were incubated in standard reaction medium in the presence of 1 μM cyclosporin A, 1 μM horseradish peroxidase, 1 μM scopoletin, and no further additions (line a), 16 μM ebselen and 2 μM reduced glutathione (line b), 2 μM catalase (line c), 16 μM TSA (line d), or 100 μM citrate (line e). P_i (0.5 mM) was added where indicated by the arrow.

induced by Ca^{2+} and P_i in concentrations similar to TSA, but required the concomitant presence of reduced glutathione. Inhibition of mitochondrial swelling and membrane protein thiol oxidation in the presence of 16 μM ebselen or reduced glutathione alone was less than 10% that observed in the presence of both reagents (results not shown).

In Fig. 3, mitochondrial H_2O_2 generation was monitored by the oxidation of scopoletin catalyzed by horseradish peroxidase in the presence of H_2O_2 (27). As observed previously by monitoring the formation of horseradish peroxidase compound II (8, 9), the H_2O_2 generation of Ca^{2+} -loaded mitochondria is largely increased by the addition of P_i (line a), an event which precedes mitochondrial swelling observed in Fig. 1. The presence of the Ca^{2+} chelator citrate completely prevented the burst in mitochondrial H_2O_2 generation induced by P_i (line e), demonstrating that this production is Ca^{2+} -dependent. Ebselen plus reduced glutathione (line b), catalase (line c), and TSA (line d) decreased significantly the detection of mitochondria-generated H_2O_2 . These compounds, which are large molecules not capable of entering intact mitochondria, remove mitochondria-generated H_2O_2 that diffuses through the membrane and would combine with horseradish peroxidase. We propose that the presence of these peroxidases, by decreasing significantly the concentration of extramitochondrial H_2O_2 , would stimulate H_2O_2 diffusion through the membrane, resulting in lower intramitochondrial H_2O_2 concentrations. This would decrease the intramitochondrial generation of the highly reactive hydroxyl radical, probably the main radical species responsible for mitochondrial membrane protein thiol oxidation leading to MPT (4, 5). Further supporting this hypothesis, mitochondrial permeabilization induced by the thiol cross-linking reagent phenylarsine oxide, which directly promotes mitochondrial membrane protein thiol cross-linking (26), leading to MPT independently of the presence of ROS, was not inhibited by TSA or ebselen (results not shown). This indicates that neither TSA nor ebselen are capable of inhibiting MPT by directly reducing mitochondrial membrane protein thiol groups.

Recently, Scorrano *et al.* (12) attempted to reproduce our results showing that MPT is inhibited by catalase and anoxia, obtaining in both situations only a partial inhibition. Based on these results, the authors concluded that MPT was stimulated but not dependent on ROS. We believe that the partial inhibition of ROS-induced MPT by H_2O_2 removing compounds is due

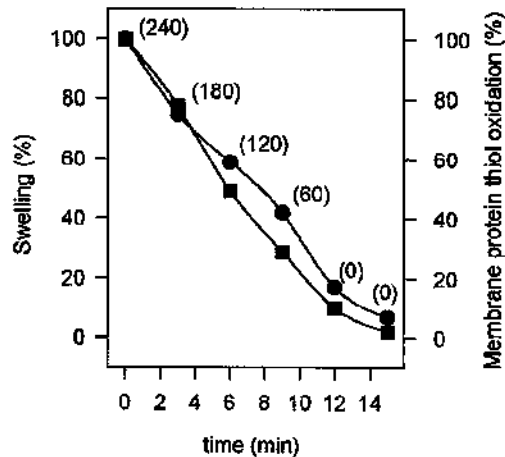


FIG. 4. Effect of oxygen concentration on mitochondrial swelling (●) and membrane protein thiol oxidation (■) induced by Ca^{2+} and P_i . Rat liver mitochondria (0.5 mg/ml) were preincubated for the periods indicated in standard reaction medium containing 1 μM carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone. After the preincubation period, the suspensions were then treated with 1 μM antimycin A, and swelling was induced by the addition of 300 μM Ca^{2+} and 2 mM P_i . Percentages of swelling extent and mitochondrial membrane protein thiol oxidation were calculated after 10 min as a proportion of total mitochondrial swelling extent or membrane protein thiol oxidation, obtained in the presence of 240 nmol/ml of oxygen. Numbers in parentheses indicate the oxygen concentration (nmol/ml) present in each experimental situation, measured using a Clarke-type electrode, as described under "Experimental Procedures."

to the fact that mitochondria-generated H_2O_2 must diffuse through the membrane in order to be removed by catalase, ebselen, or TSA. Therefore, if mitochondrial ROS generation is too intense, as occurs under experimental conditions in which mitochondrial permeabilization is very fast, part of the generated H_2O_2 may accumulate, decreasing the inhibitory effect of these peroxidases. Indeed, the authors (12) observed that catalase presented a larger inhibitory effect on MPT promoted under low mitochondrial Ca^{2+} loads. The observation that MPT induced by uncouplers was not completely inhibited by the lack of molecular oxygen, as detected by a Clarke electrode (12), is not so readily explained, since mitochondria in this situation are expected not to generate ROS. However, it is important to remember that even under very low oxygen tensions, many organic molecules remain tightly bound to molecular oxygen. The experiments shown in Fig. 4 were designed to verify the efficiency of oxygen removal from a mitochondrial suspension. Here, respiring mitochondria were incubated in a closed glass chamber in the presence of the proton ionophore carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone and allowed to gradually consume the oxygen present in the reaction medium. After different time periods, mitochondrial respiration was inhibited with antimycin, resulting in different final oxygen tensions, as measured by a Clarke electrode. After total inhibition of mitochondrial respiration occurred, mitochondrial swelling (●) and membrane protein thiol oxidation (■) induced by Ca^{2+} and P_i added at different oxygen tensions (see numbers in parentheses) were measured. Under these experimental conditions, in which mitochondria were uncoupled and Ca^{2+} uptake was driven through a high Ca^{2+} gradient (300 μM Ca^{2+} , see Refs. 5 and 8), mitochondrial swelling and membrane protein thiol oxidation decreased after oxygen concentrations were progressively lowered by mitochondrial respiration. Interestingly, we observed that when mitochondria were allowed to respire during 12 min, and oxygen concentration measured by a Clarke electrode indicated an apparent total anoxia (see numbers in parentheses in Fig. 4), a small but significant mi-

tochondrial swelling and membrane protein thiol oxidation could still be observed. This swelling did not occur when mitochondria were allowed to respire for an additional period of 3 min, suggesting that even when the electrode indicates complete anoxia in the reaction medium, a small quantity of oxygen may still be present in the mitochondrial suspension, allowing for the generation of ROS and occurrence of MPT.

In conclusion, the present results show that MPT is fully inhibited by the lack of molecular oxygen or the presence of one of three compounds capable of removing extramitochondrial H_2O_2 , namely catalase, ebselen, and TSA. TSA is known to protect biomolecules from oxidative damage due to its thiol peroxidase activity (20), and the results obtained suggest that it may play an important role *in vivo* preventing the occurrence of MPT. MPT inhibition by TSA can be attributed to its hydrogen peroxide removal activity, since no inhibition was observed in the presence of C47S (Fig. 1, line f), a site-specific mutant of TSA which lacks thiol peroxidase activity and does not protect biomolecules from oxidative damage (18–20). Yeast TSA possesses mammalian isoforms, located in both mitochondria (23, 29) and the cytosol (18), although the intramitochondrial forms are probably more important for inhibition of MPT. SP-22 is one of the mammalian mitochondrial isoforms of TSA and seems to account for about 5% of mitochondrial matrix proteins in the bovine adrenal cortex, where steroid hydroxylation generates large amounts of ROS (23). Also, the TSA isoform thioredoxin peroxidase was shown to inhibit endogenous H_2O_2 accumulation which precedes apoptosis induced by a variety of compounds (30), strongly suggesting that these enzymes are important in the defense of mammalian mitochondria against oxidative stress.

Acknowledgments—We acknowledge Mathews P. C. Vercesi and Caroline S. Fukushima for the preparation of rat liver mitochondria and Dr. R. F. Castilho for the helpful suggestions. We thank Dr. S. G. Rhee (Cell Signaling Laboratory, NHLBI, National Institutes of Health) and Dr. H. Z. Chae (Department of Biology, Chonnam University, Korea) for the kind donation of the MER-5 protein and for providing the equipment to purify TSA, C170S, and C47S.

REFERENCES

1. Gunter, T. E., Gunter, K. K., Sheu, S.-S., and Gavin, C. E. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, C313–C339.
2. Zaratti, M., and Szabó, I. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 139–176.
3. Lehninger, A. L., Vercesi, A. E., and Bababunmi, E. A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 6842–6846.
4. Vercesi, A. E., Kowaltowski, A. J., Grijalba, M. T., Meinicke, A. R., and Castilho, R. F. (1997) *Biosci. Rep.* **17**, 43–52.
5. Castilho, R. F., Kowaltowski, A. J., Meinicke, A. R., and Vercesi, A. E. (1995) *Free Radical Biol. & Med.* **18**, 479–486.
6. Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (1995) *Am. J. Physiol.* **269**, C141–C147.
7. Valle, V. G. R., Fagian, M. M., Parentoni, L. S., Meinicke, A. R., and Vercesi, A. E. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 1–7.
8. Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (1996) *FEBS Lett.* **378**, 150–152.
9. Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., Grijalba, M. T., Bechara, E. J. H., and Vercesi, A. E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2929–2934.
10. Fagian, M. M., Pereira-da-Silva, L., Martins, I. S., and Vercesi, A. E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19955–19960.
11. Castilho, R. F., Kowaltowski, A. J., and Vercesi, A. E. (1996) *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 523–529.
12. Scorrano, A., Petronilli, V., and Bernardi, P. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12295–12299.
13. Pastorino, J. G., Snyder, J. W., Serroni, A., Hoek, J. B., and Farber, J. L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13791–13798.
14. Griffiths, E., and Halestrap, A. P. (1995) *Biochem. J.* **307**, 93–98.
15. Zamzami, N., Hirsch, T., Dallaporta, B., Petit, P. X., and Kroemer, G. (1997) *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 185–193.
16. Skulachev, V. P. (1996) *FEBS Lett.* **397**, 7–10.
17. Kim, K., Kim, I. H., Lee, K.-Y., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4704–4711.
18. Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S. G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7017–7021.
19. Chae, H. Z., Chung, S. J., and Rhee, S. G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27670–27678.
20. Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S.-W., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15315–15321.
21. Nogoceke, E., Gommel, D. U., Kieb, M., Kalisz, H. M., and Flohé, L. (1997) *Biol. Chem.* **378**, 827–836.
22. Kim, I. H., Kim, K., and Rhee, S. G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6018–6022.
23. Watabe, S., Kohno, H., Kouyama, H., Hiroi, T., Yago, N., and Nakazawa, T. (1994) *J. Biochem. (Tokyo)* **115**, 648–654.
24. Ishii, T., Kawane, T., Taketani, S., and Bannai, S. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 970–975.
25. Sies, H. (1993) *Free Radical Biol. & Med.* **14**, 313–323.
26. Kowaltowski, A. J., Vercesi, A. E., and Castilho, R. F. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 385–402.
27. Boveris, A., Martino, E., and Stoppani, A. O. M. (1977) *Anal. Biochem.* **80**, 145–158.
28. Chae, H. Z., Uhm, T. B., and Rhee, S. G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7022–7026.
29. Tsuji, K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Obinata, M. (1995) *Biochem. J.* **307**, 377–381.
30. Zhang, P., Liu, B., Kang, S.-W., Seo, M. S., Rhee, S. G., and Obeid, L. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30615–30618.

3.2.3. Discussão do 2º Trabalho

Nesse segundo trabalho pudemos comprovar que, além da catalase, dois outros compostos com atividade peroxidásica (a tiorredoxina peroxidase e o ebselen) eram capazes de inibir a TPM induzida por Ca^{2+} e P_i (Fig. 1 e 2).

A tiorredoxina peroxidase, isolada de leveduras pelo Prof. Luis E.S. Netto, é uma peroxidase tiólica, capaz de catalisar a degradação de H_2O_2 a H_2O na presença de um redutor ditiólico (NETTO *et al.*, 1996). Isoformas dessa enzima podem ser encontradas em concentrações variadas em tecidos de mamíferos, e algumas são localizadas em mitocôndrias (WATABE *et al.*, 1997). A alta concentração dessa enzima em tecidos expostos a intensas condições de estresse oxidativo, como células suprenais, sugere que sua principal função seja antioxidante. Em nosso sistema, comprovamos que o efeito inibitório da tiorredoxina peroxidase sobre a TPM se deve a sua atividade peroxidásica através do uso de um análogo mutante (C47S) que não possui atividade peroxidásica, e que não apresentou efeito inibitório (Fig. 1). A C170S, um análogo da tiorredoxina peroxidase que possui atividade peroxidásica mas não é capaz de receber elétrons da tiorredoxina, um redutor ditiólico endógeno, inibiu parcialmente a TPM induzida por Ca^{2+} e P_i .

O ebselen é um composto selenoorgânico, análogo estrutural do grupo funcional da glutathione peroxidase (SIES, 1993). Semelhantemente à tiorredoxina peroxidase, age como uma peroxidase tiólica. Pudemos comprovar que o ebselen também possui a habilidade de inibir a TPM, mas necessitava da presença concomitante de glutathione reduzida como um redutor (Fig. 1). Isso indica que esse composto não é capaz de utilizar redutores presentes na preparação mitocondrial para se regenerar após remover o H_2O_2 .

Além de prevenir o inchamento mitocondrial associado à TPM, observamos que a tiorredoxina peroxidase, ebselen e catalase diminuíam a detecção de H_2O_2 gerado por mitocôndrias tratadas com Ca^{2+} e P_i (Fig. 3). Isso se deve, certamente, à remoção do H_2O_2 por esses compostos. Essa remoção previne a oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial associada à TPM (Fig. 2). A necessidade de concentrações mais altas de ebselen e tiorredoxina peroxidase para obter inibições comparáveis à catalase está de acordo com as diferenças de atividades catalíticas dessas enzimas (NETTO *et al.*; 1996; SIES, 1993).

Na Fig. 4, demonstramos que a retirada gradual de oxigênio do meio de reação, realizada pela própria respiração mitocondrial, inibe de maneira dose-dependente o inchamento mitocondrial induzido por Ca^{2+} e P_i . Foi interessante notar que a oxidação de tióis protéicos também foi inibida pela retirada de O_2 , de maneira proporcional à inibição de inchamento. Esses resultados trazem mais uma evidência de que a TPM induzida por Ca^{2+} e P_i é causada por EROs, e demonstram que a permeabilização mitocondrial é proporcional à oxidação de tióis protéicos.

Durante a preparação desse trabalho, foi publicado um estudo demonstrando que a hiperexpressão da tiorredoxina peroxidase inibia a apoptose induzida por uma variedade de estímulos (ZHANG *et al.*, 1997). Esse estudo pôde detectar que na presença de tiorredoxina peroxidase havia inibição do estresse oxidativo mitocondrial que precedia a apoptose. Nosso estudo complementa esses dados, demonstrando que a tiorredoxina peroxidase é capaz de remover H_2O_2 gerado pela mitocôndria e prevenir a TPM, uma consequência do estresse oxidativo mitocondrial. Como a ocorrência de TPM é um passo

necessário para a indução de apoptose em diversos sistemas (KROEMER *et al.*, 1998), esse pode ser o principal mecanismo de ação antiapoptótica dessa enzima.

3.3. - 3º Trabalho

KOWALTOWSKI, A.J., VERCESI, A.E. E FISKUM, G. Bcl-2 Prevents Mitochondrial Permeability Transition and Cytochrome *c* Release Due to Increased Mitochondrial Reducing Power. **FASEB J.** (submetido).

3.3.1. Introdução ao 3º Trabalho

A descoberta que a TPM poderia desencadear a apoptose em diversos modelos de morte celular programada (veja item 1.7.) atraiu grande interesse na comunidade científica, que passou novamente a se concentrar em estudos de bioenergética mitocondrial. Foi constatado que a TPM poderia desencadear a apoptose através da liberação de dois componentes do espaço intermembranas mitocondrial para o citosol, através do inchamento mitocondrial intracitoplasmático, resultando em ruptura física da membrana mitocondrial externa (SCARLETT & MURPHY, 1997). O primeiro componente do espaço intermembranas da mitocôndria caracterizado como sendo pro-apoptótico foi o fator indutor de apoptose, uma flavoproteína de 57 Kd que apresenta homologia com oxidoredutases bacterianas (SUSIN *et al.*, 1999). A adição do fator indutor de apoptose a núcleos isolados ou a microinjeção em células leva ao aparecimento de características apoptóticas (SUSIN *et al.*, 1999). Outro componente normalmente presente no espaço intermembranas da mitocôndria que leva a apoptose se liberado para o citosol é o citocromo *c* mitocondrial (KLUCK *et al.*, 1997; ADACHI *et al.*, 1997). Normalmente, o

citocromo *c* é intimamente ligado à face citoplasmática da membrana mitocondrial interna, podendo também ser liberada da mitocôndria durante a TPM quando ocorre ruptura da membrana externa.

Interessantemente, constatou-se que o Bcl-2, uma proteína antiapoptótica que é hiperexpressada em diversos tumores, inibia tanto a liberação mitocondrial de fator indutor de apoptose quanto de citocromo *c* (KROEMER *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 1997; KLUCK *et al.*, 1997). Os estudos comprovando que esse era o principal mecanismo antiapoptótico dessa proteína sugeriram um papel determinante para a TPM na indução da apoptose.

A partir desses estudos, nos interessou caracterizar qual o mecanismo pelo qual o Bcl-2 inibia a TPM. Em um trabalho anterior, SHIMIZU *et al.* (1998) haviam sugerido que o Bcl-2 preveniria a TPM por aumentar o potencial de membrana mitocondrial basal, agindo como uma bomba de prótons. Nesse 3º trabalho, comprovamos que o Bcl-2 aumenta o potencial de membrana mitocondrial, e demonstramos também que ele é capaz de levar a uma maior resistência mitocondrial contra o estresse oxidativo.

Como modelo experimental, foram usadas culturas de células tumorais transfectadas com um vírus contendo o gene do Bcl-2 humano ou um vírus controle. Os experimentos foram conduzidos em suspensões dessas células tratadas com digitonina, uma condição em que é possível estudar as organelas intracelulares *in situ* (FISKUM *et al.*, 1980). Como nessas condições não é possível estudar inchamento mitocondrial, foi monitorizado o potencial de membrana mitocondrial como parâmetro para avaliar a permeabilidade da membrana mitocondrial interna.

3º Trabalho

**3.3.2. BCL-2 PREVENTS MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION
AND CYTOCHROME C RELEASE DUE TO INCREASED MITOCHONDRIAL
REDUCING POWER**

Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome *c* release due to increased mitochondrial reducing power

Alicia J. Kowaltowski^{1,2}, Anibal E. Vercesi² and Gary Fiskum^{1,*}

¹Department of Anesthesiology, The University of Maryland Baltimore,
Baltimore, MD, U.S.A.

²Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed at The University of Maryland at Baltimore Anesthesiology Research Lab, Medical School Teaching Facility 5-34, 685 West Baltimore Street, Baltimore, MD, 21201. Office: +01 (410) 706-4711, Fax: +01 (410) 706-2550, e-mail: gfiskum@anesthlab.ab.umd.edu

Shortened Title: Mitochondrial permeability transition and Bcl-2

Abstract

Digitonin-permeabilized PC12 and GT1-7 neural cells respiring on malate and glutamate exhibited a cyclosporin A-sensitive decrease in mitochondrial membrane potential induced by Ca^{2+} in the presence of mitochondrial permeability transition (MPT) inducers *t*-butyl hydroperoxide (*t*-bOOH) or phenylarsine oxide (PhAsO). However, Bcl-2 overexpressing transfected cells (Bcl-2(+)) underwent a decrease in mitochondrial membrane potential only in the presence of the sulfhydryl oxidant PhAsO. Under these conditions, when a drop in mitochondrial membrane potential was induced by Ca^{2+} plus a pro-oxidant, it was accompanied by mitochondrial swelling and release of the pro-apoptotic factor cytochrome *c* from the mitochondria. Bcl-2(+) cells treated with Ca^{2+} plus *t*-bOOH suffered a substantially lower extent of oxidation of pyridine nucleotides than Bcl-2(-) cells. When the level of reduced pyridine nucleotides was maintained high in Bcl-2(-) cells by blocking oxidation at Complex I of the electron transport chain with rotenone, Bcl-2(+) and (-) cells respiring on succinate reacted in a similar manner and exhibited the MPT only when treated with PhAsO. We conclude that the increased reducing power of Bcl-2(+) cells is a sufficient explanation for their resistance to MPT under conditions of oxidative stress induced by Ca^{2+} plus *t*-bOOH. Since the MPT may induce cytochrome *c* release during apoptosis in some cells, the higher reducing power of Bcl-2(+) cells may contribute to their resistance to cell death.

Key words: apoptosis, calcium, oxidative stress, pyridine nucleotides

Introduction

Mitochondria isolated from a wide variety of tissues are capable of undergoing a Ca^{2+} -induced, nonspecific inner mitochondrial membrane permeabilization, known as the mitochondrial permeability transition (MPT) (1-3). MPT begins as a permeabilization of the inner mitochondrial membrane to protons, resulting in a drop in mitochondrial membrane potential, and progresses as a loss of electrophoretic Ca^{2+} uptake capacity, colloid osmotic swelling of the organelle and eventually even loss of matrix proteins. During this process, mitochondria may release cytochrome *c* from the intermembrane space into the cytosol, an event which has recently been demonstrated to be a trigger of apoptotic cell death (4, 5). MPT may also be a cause of necrotic cell death under situations such as ischemia/reperfusion (6, 7). The immune suppressor cyclosporin A is an efficient MPT inhibitor in isolated mitochondrial suspensions, and has been used as a marker for MPT in various cell death paradigms (6, 8-10).

Bcl-2 is an anti-apoptotic protein located primarily in the outer mitochondrial membrane, mostly at the contact sites where the outer membrane is closely associated with the inner mitochondrial membrane (11). The anti-apoptotic activity of this protein has been related to its property to prevent the release of cytochrome *c* from mitochondria (12, 13). Bcl-2 has also been demonstrated to inhibit MPT (14-16), although the mechanism by which this protection occurs has not been clearly elucidated. Evidence indicates that Bcl-2 offers mitochondria an increased resistance against a decline in membrane potential (15), while also increasing the total mitochondrial Ca^{2+} uptake capacity (17), properties that could contribute to the prevention of MPT.

Bcl-2 overexpression also increases the overall reductive capacity of cells (18). Since the occurrence of MPT has been linked to a drop in the mitochondrial reductive capacity and/or increase in mitochondrial generation of reactive oxygen species (ROS) (3), the resistance of Bcl-2 overexpressing cells to MPT may be related to this higher reductive capacity. Indeed, we have shown previously that MPT promoted by several inducers, including *t*-butyl hydroperoxide (*t*-bOOH) (19) and inorganic phosphate (20, 21) depends on the generation of ROS. In this report, we investigate the mechanism by which Bcl-2 inhibits MPT.

Our findings suggest that the increased reductive capacity of Bcl-2 overexpressing cells is sufficient to explain the increased resistance to MPT.

Materials and Methods

Cell Cultures - PC12 and immortalized hypothalamic GT1-7 neuronal cell lines transfected with the *bcl-2* gene (Bcl-2(+)) or with a control retroviral construct (Bcl-2(-)) were maintained as described previously (17, 22). Prior to the experiments, the cells were trypsinized and suspended in growth media supplemented with 5 mM EGTA. Suspended cells were kept at room temperature for up to 5 hours. Cell viability, as assessed by a cell count in Trypan Blue, was >90% even after 5 h at room temperature.

Standard incubation conditions - Just prior to digitonin permeabilization, the suspended cells were centrifuged and resuspended in 130 mM KCl, 5 mM HEPES (pH 7.0), 5 mM malate and 5 mM glutamate at 30°C. Other additions are described in the figure legends.

Determination of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) - Mitochondrial $\Delta\Psi$ was estimated through fluorescence changes of safranin O (5 μ M) recorded on a Perkin-Elmer LS-3 fluorescence spectrophotometer equipped with continuous stirring, operating at excitation and emission wavelengths of 485 and 586 nm, respectively (23).

Electron microscopy - Samples were fixed overnight in a 4% formaldehyde plus 1% glutaraldehyde solution, and postfixed in 1% osmium tetroxide. Dehydration was performed in a series of ethanol and propylene oxide extractions, prior to sample embedding in Polibed[®] 812. Sections were cut at 0.1 micron and stained with uranyl acetate plus lead citrate. Electron micrographs were obtained using a JOEL 1200 EX electron microscope.

Measurements of cytochrome c release - Aliquots of the digitonin-permeabilized cell suspensions were centrifuged at 10,000 x g for 2 min. The supernatants were collected and used for cytochrome c immunoblots, performed as described in ref. 24.

Determination of NAD(P) redox state - The redox state of pyridine nucleotides in digitonin-permeabilized cells was followed fluorometrically at 352 nm excitation and 464 nm emission wavelengths. Nucleotide oxidation was calculated as a percentage of the oxidation induced by FCCP. Statistical differences were tested using Student's *t* test.

Materials - *t*-BOOH, PhAsO, safranin O, rotenone, succinate, malate, glutamate, digitonin, FCCP and alamethicin were purchased from Sigma Chemical Co., Cyclosporin A was from Alexis Corporation.

Results

In suspensions of isolated mitochondria, nonspecific mitochondrial permeabilization due to the permeability transition can be followed by measuring the decrease in absorbance of the suspension as a result of mitochondrial swelling (1). However, in intact cells, evaluating mitochondrial swelling is not as straightforward. Alternatively, investigators often monitor the drop in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) as a marker of MPT (5, 8, 9). In this work, we have studied MPT as assessed by the decline in mitochondrial $\Delta\Psi$, estimated through safranin O fluorescence changes in digitonin-permeabilized cells (25), where factors that regulate the MPT can be rigorously controlled.

Fig. 1 displays typical strip-chart recorder tracings of mitochondrial $\Delta\Psi$ sustained by malate/glutamate-supported (NAD-linked) respiration in digitonin-permeabilized PC12 cells, incubated in the presence of 8 μM Ca^{2+} . In the absence of exogenous prooxidants, both Bcl-2(-) and Bcl-2(+) cells were capable of generating and maintaining their $\Delta\Psi$ for over 10 min under these conditions (upper panels, lines a). Note, however, that the $\Delta\Psi$ of the Bcl-2(+) cells is apparently larger than the Bcl-2(-) cells. This difference was observed even in the absence of Ca^{2+} , and using isolated mitochondrial suspensions from these cells (not shown), confirming that the higher $\Delta\Psi$ in the Bcl-2(+) PC12 cells cannot be attributed only to a higher mitochondrial content or to a difference in Ca^{2+} uptake response. Indeed, it has been demonstrated previously that Bcl-2 overexpressing mitochondria exhibit a relatively higher $\Delta\Psi$ (15).

When the cell suspensions were treated with the MPT inducer phenylarsine oxide (PhAsO, 15 μM) (26) (upper panels, lines c), a substantial decrease in $\Delta\Psi$ was observed in both Bcl-2(-) and Bcl-2(+) cells. The addition of the MPT inducer *t*-butyl hydroperoxide (200 μM , *t*-bOOH, see ref. 19) to the cell suspensions induced a Ca^{2+} -dependent drop in $\Delta\Psi$ in the PC12 Bcl-2(-) cells, but not in the Bcl-2(+) cells (lines b). These observations suggest that Bcl-2 selectively inhibits MPT, depending on the inducer used. When the MPT inhibitor cyclosporin A (lower panels) was added to the cells, the drop in $\Delta\Psi$ induced by PhAsO (lower

panels, lines c) or *t*-BOOH (lines b) was substantially inhibited, confirming the relationship between the MPT and the drop in $\Delta\Psi$.

In order to confirm that the results observed were not specific for PC12 cells, we conducted the experiments shown in Fig. 2, using Bcl-2(-) and Bcl-2(+) neuronal GT1-7 cells. Although a higher Ca^{2+} load (20 μM) was necessary to allow the induction of the MPT, Bcl-2(-) GT1-7 cells also exhibited a drop in $\Delta\Psi$ in the presence of PhAsO (line c) and *t*-BOOH (line b), while Bcl-2(+) cells only presented a $\Delta\Psi$ decrease in the presence of PhAsO (line c). Cyclosporin A inhibited the drop in $\Delta\Psi$ in GT1-7 cells, although a higher concentration (5 μM) was required than that necessary for PC12 cells (lower panels).

In isolated mitochondrial suspensions, MPT causes colloid osmotic swelling of the organelle (1). This alteration in the mitochondrial structure is thought to be the cause of mitochondrial release of cytochrome *c*, since it results in disruption of the outer mitochondrial membrane (27). In Fig. 3, we assessed changes in mitochondrial volume under conditions similar to Fig. 1, using electron microscopy. As reported earlier for other cell types (25), the general structure of the PC12 cells was maintained following digitonin permeabilization of the plasma membrane. Also, no striking difference in cellular or mitochondrial morphology was apparent between the Bcl-2(-) and Bcl-2(+) cells (Panels A). When the cells were treated with Ca^{2+} at concentrations that did not induce spontaneous decrease in mitochondrial $\Delta\Psi$ (see Fig. 1), the mitochondria of both Bcl-2(-) and Bcl-2(+) cells exhibited normal, non-swollen, morphologies (Panels B). However, the Bcl-2(-) cells displayed a substantial increase in mitochondrial volume and altered appearance when treated with *t*-BOOH, while Bcl-2(+) mitochondria maintained characteristics similar to the controls (Panels C). Both Bcl-2(-) and Bcl-2(+) mitochondria were swollen in the presence of PhAsO (Panels D).

In a variety of experimental conditions, large amplitude mitochondrial swelling associated with MPT is followed by the release of cytochrome *c* from the mitochondrial intermembrane space into the cytosol, an event which can trigger apoptotic cell death through caspase activation (28). Fig. 4 depicts immunoblots used to detect cytochrome *c* in the supernatants obtained following centrifugation of cell suspensions incubated under conditions similar to those used in the experiments described by Figs. 1 and 2. We observed that all cell suspensions treated with PhAsO released cytochrome *c* into the media, but only Bcl-2(-) cells

released cytochrome *c* upon the addition of *t*-BOOH. Release of cytochrome *c* under these conditions was extensive and often approached the extent obtained in the presence of alamethicin, an artificial, non-specific, pore former. Consistent with the effects on mitochondrial membrane potential (Figs. 1 and 2), cyclosporin A eliminated cytochrome *c* release elicited by Ca^{2+} and *t*-BOOH and partially blocked the release induced by Ca^{2+} and PhAsO.

As *t*-BOOH induces MPT via its ability to oxidize reduced glutathione and pyridine nucleotides (19, 29), we measured the effect of Bcl-2 on the pyridine nucleotide redox state of both PC12 and GT1-7 cells lines in the absence and presence of *t*-BOOH. Previous studies have shown that Bcl-2(+) cells contain significantly higher contents of both NADH and NADPH (18). Mitochondria within Bcl-2(+) cells are also more resistant to the oxidation of pyridine nucleotides that can occur in response to the accumulation of large Ca^{2+} loads (30). In addition to these observations, we found that the degree to which pyridine nucleotides were oxidized upon addition of 200 μM *t*-BOOH was significantly lower in Bcl-2(+) versus Bcl-2(-) GT1-7 or PC12 cells (Fig. 5, lines b). Indeed, in a series of six separate experiments, the addition of 200 μM *t*-BOOH in the presence of 8-20 μM Ca^{2+} resulted in a greater oxidation of pyridine nucleotides in Bcl-2(-) than Bcl-2(+) cells (i.e. $68 \pm 5\%$ in Bcl-2(-) versus $35 \pm 8\%$ in Bcl-2(+) PC12 cells; $p < 0.05$, and $78 \pm 10\%$ in Bcl-2(-) versus $54 \pm 4\%$ in Bcl-2(+) GT1-7 cells; $p > 0.05$, as compared to the oxidation induced by FCCP). This oxidation of pyridine nucleotides could not be attributed to the drop in membrane potential following MPT, since it was not inhibited by cyclosporin A (results not shown). When, however, the concentration of added *t*-BOOH was raised to 800 μM , the subsequent oxidation of pyridine nucleotides was more substantial in Bcl-2(+) cells and reached levels not significantly different ($65\% \pm 11$) to those attained in Bcl-2(-) cells (70 ± 6 , Fig. 5, lines c).

The results shown in Fig. 6 were designed to verify if the increased resistance to pyridine nucleotide oxidation of the Bcl-2(+) cells observed in Fig. 5 was, indeed, the cause of the increased resistance of these cells to MPT induced by *t*-BOOH. In the upper traces, increasing concentrations of *t*-BOOH were added to both Bcl-2(-) and Bcl-2(+) PC12 cells, in order to promote a more substantial pyridine nucleotide oxidation in the Bcl-2(+) cells (see Fig. 5). In Bcl-2(-) cells, the addition of 200 μM (line b), 400 μM (line c) or 800 μM (line d) *t*-

bOOH promoted a similar rate of $\Delta\Psi$ decrease, a result consistent with the observation in Fig. 5 that 200 μM *t*-bOOH oxidized pyridine nucleotides almost completely in Bcl-2(-) cells. However, in Bcl-2(+) cells, a gradual increase in $\Delta\Psi$ loss could be observed with higher *t*-bOOH concentrations (compare lines b-d), indicating that even Bcl-2 overexpressing cells can suffer MPT if sufficient *t*-bOOH is added to promote extensive pyridine nucleotide oxidation. In all cases, the drop in $\Delta\Psi$ was fully prevented by cyclosporin A (lines a), confirming that it is related to MPT. In contrast to the different dose-response relationships between *t*-bOOH and MPT in Bcl-2(-) and Bcl-2(+) cells, similar dose-response relationships were observed for PhAsO (Fig. 6, lower traces). The extent of the decline in $\Delta\Psi$ was similar between Bcl-2 (-) and Bcl-2(+) PC12 cells when either subsaturating concentrations of PhAsO (2 μM) or saturating concentrations (15 μM) were employed.

In Fig. 7, we exposed permeabilized PC12 the cells to the NAD-linked substrates malate and glutamate in the presence of the Complex I inhibitor rotenone in order to increase available reducing power in an attempt to inhibit the MPT. The mitochondria within the cells were energized with succinate, a Complex II substrate insensitive to rotenone inhibition. Under these conditions, both Bcl-2(-) and Bcl-2(+) PC12 cells presented a strong resistance to $\Delta\Psi$ decrease induced by *t*-bOOH (lines a and b, 200 and 800 μM , respectively), but still exhibited a decrease in $\Delta\Psi$ induced by PhAsO (results not shown). A *t*-bOOH-induced drop in $\Delta\Psi$ was observed only if malate and glutamate were omitted, rendering the pyridine nucleotides more susceptible to oxidation (lines c and d, 200 and 800 μM *t*-bOOH, respectively). Again, Bcl-2(+) cells displayed a *t*-bOOH-induced decline in $\Delta\Psi$ only in the presence of higher concentrations of *t*-bOOH. Thus, the results shown in Fig. 6 demonstrate that Bcl-2(+) cells are capable of undergoing MPT if their pyridine nucleotides are substantially oxidized, while the results in Fig. 7 show that Bcl-2(-) cells are resistant to MPT if their nucleotide redox state is maintained more reduced.

Discussion

Bcl-2 has been widely demonstrated to inhibit apoptotic cell death induced by a variety of different stimuli (28, 31), and probably acts by more than one mechanism. As an example, Bcl-2 can prevent the activation of caspases (28, 32), thus preventing cell death induced by cytochrome *c* microinjection (33). Bcl-2 has also been demonstrated to block cytochrome *c* release from mitochondria (12, 13), a pro-apoptotic occurrence upstream from caspase activation.

Cytochrome *c* release from mitochondria may occur in response to MPT (27), in response to redistribution of Bax, a pro-apoptotic protein of the Bcl-2 family, to mitochondria (32, 34), or in response to mitochondrial Ca^{2+} uptake in a MPT-independent manner (24). Several studies have shown that Bcl-2 prevents the onset of MPT, thus preventing the drop in $\Delta\Psi$, mitochondrial swelling and cytochrome *c* release (14, 15).

In this report, we studied the mechanism by which Bcl-2 inhibits MPT, as assessed by a drop in mitochondrial $\Delta\Psi$ (Figs. 1 and 2) which was accompanied by mitochondrial swelling (Fig. 3) and cytochrome *c* release (Fig. 4). We found that MPT and cytochrome *c* release may be promoted in both Bcl-2(-) and Bcl-2(+) cells when these cells were treated with either PhAsO (Figs. 1, 2, 3 and 4), with similar dose response curves (Fig. 6). However, 200 μM *t*-bOOH only induced a drop in mitochondrial membrane potential in Bcl-2(-) cells (Figs. 1, 2, 3 and 4), whereas the MPT was only observed with Bcl-2(+) cells at extremely high concentrations of *t*-bOOH (800 μM - Fig. 6 and 7).

PhAsO and *t*-bOOH act in different manners to induce MPT. *t*-bOOH oxidizes mitochondrial glutathione and pyridine nucleotides. As a result, there is a depletion of substrates for mitochondrial glutathione peroxidase and reductase. Reduction in the activities of these enzymes results in an accumulation of Ca^{2+} -stimulated mitochondrially-generated reactive oxygen species (ROS) (19). The accumulated ROS then promote the oxidation of mitochondrial membrane protein thiols, resulting in nonspecific mitochondrial permeabilization (3, 19). PhAsO is a dithiol reagent, and reacts directly with membrane protein thiols, promoting MPT independently of ROS or pyridine nucleotide oxidation (3, 35). Thus, our results suggest that Bcl-2 prevents MPT at a step upstream of membrane protein thiol

oxidation. Indeed, 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid and arsine oxide, two other MPT inducers which act as dithiol reagents, were also capable of inducing $\Delta\Psi$ decrease in both Bcl-2(-) and Bcl-2(+) cells (results not shown).

Previously, Zamzami *et al* (36) have demonstrated that the use of the dithiol reagent diamide can induce a drop in mitochondrial membrane potential and overcome the apoptosis-inhibitory effects of Bcl-2. Here, we have characterized the membrane potential drop induced by either a dithiol reagent or a hydroperoxide as the MPT and investigated the mechanism through which Bcl-2 inhibits this loss of membrane potential and the associated loss of cytochrome *c*. Our finding that Bcl-2 protects against the oxidation of mitochondrial pyridine nucleotides, thus preventing MPT induced by *t*-bOOH but not dithiol reagents provides a mechanistic explanation for our results, and possibly those of others.

MPT has been demonstrated to be closely linked to the mitochondrial redox state and to be promoted by mitochondrial oxidative stress, such as increased mitochondrial ROS generation and/or impaired detoxification (for review, see ref. 3). Indeed, MPT induced by *t*-bOOH is dependent on a Ca^{2+} -stimulated increase in ROS generation by mitochondria (19). Since Bcl-2 increases the reductive capacity of cells (18), it is expected that this increased reducing power would affect the inducibility of MPT. A primary finding of this study is that this increased reductive capacity is the main mechanism through which Bcl-2 inhibits MPT. This hypothesis is supported by the observation that PhAsO, which acts by directly reacting with mitochondrial membrane protein thiols (27, 35), can overcome the inhibition of MPT by Bcl-2 (Figs. 1, 2, and 6). Also, treating Bcl-2(+) cells with very large concentrations of *t*-bOOH (800 μM) can promote a more extensive pyridine nucleotide oxidation (Fig. 5) and decrease in membrane potential (Fig. 6). Thus, not all effects of Bcl-2 overexpression are related to the presence of the protein itself and care must be used when interpreting results in Bcl-2 overexpressing systems. In our system Bcl-2(-) cells could be made to exhibit a low sensitivity to MPT similar to that of Bcl-2(+) cells if the pyridine nucleotide state was maintained reduced by the presence of malate and glutamate in the presence of rotenone (Fig. 7).

Under our conditions cytochrome *c* release was elicited in a manner directly related to MPT and mitochondrial swelling (Fig. 4). In cytochrome *c*-induced cell death, this mechanism

of cytochrome *c* release may not always occur (28). However, many studies have shown that MPT and cytochrome *c* release are early events in different models of apoptosis (5, 8, 12, 13). Thus, we believe our observations concerning the mechanisms of inhibition of MPT by Bcl-2 provide a plausible explanation for the prevention of cytochrome *c* release promoted by Bcl-2 in many situations, and particularly under conditions that favor oxidative stress. The observation that Bcl-2 prevention of apoptosis induced by tumor necrosis factor or ultraviolet light can be overcome by glutathione depletion of these cells (37) supports this proposal.

Acknowledgements

We thank S.J. Russell for the excellent technical assistance. Transfected cells were kindly provided by Dr. Dale Bredesen, Burnham Research Institute, La Jolla, CA. Supported by FAPESP, NIH grant NS34152 and the Bayer Corporation.

Footnotes

Abbreviations used were: carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), cyclosporin A (CsA), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$), mitochondrial permeability transition (MPT), phenylarsine oxide (PhAsO), reactive oxygen species (ROS), *t*-butyl hydroperoxide (*t*-bOOH).

References

1. Zoratti, M., and Szabo, I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139-176
2. Bernardi, P. (1996) The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 5-9
3. Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R., and Castilho, R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci. Rep.* 17, 43-52.
4. Cai, J., Yang, J., and Jones, D.P. (1998) Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 139-149
5. Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 619-642
6. Halestrap, A.P., Connern, C.P., Griffiths, E.J., and Kerr, P.M. (1997) Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol. Cell. Biochem.* 174, 167-172
7. Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., and Herman, B. (1997) The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol. Cell. Biochem.* 174, 159-165
8. Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., and Herman, B. (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 177-196
9. Dubinsky, J.M., and Levi, Y. (1998) Calcium-induced activation of the mitochondrial permeability transition in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 53, 728-741
10. Friberg, H., Ferrand-Drake, M., Bengtsson, F., Halestrap, A.P., and Wieloch, T. (1998) Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J. Neurosci.* 18, 5151-5159

11. Reed, J.C., Jurgensmeier, J.M., and Matsuyama, S. (1998) Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 127-137
12. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136
13. Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., and Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132
14. Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184, 1331-1341
15. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1455-1459
16. Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., and Kroemer, G. (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187, 1261-1271
17. Murphy, A.N., Bredesen, D.E., Cortopassi, G., Wang, E., and Fiskum, G. (1996) Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9893-9898
18. Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Park, S.M., Holleran, A.L., Murphy, A.N., Fiskum, G., Kane, D.J., Testa, M.P., Kayalar, C., and Bredesen, D.E. (1996) Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J. Neurochem.* 67, 1259-1267
19. Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Meinicke, A.R., Bechara, E.J., and Vercesi, A.E. (1995) Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 479-486
20. Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J., and Vercesi, A.E. (1996) Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial

membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 271, 2929-2934

21. Kowaltowski, A.J., Netto, L.E., and Vercesi, A.E. (1998) The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *J. Biol. Chem.* 273, 12766-12769

22. Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T., and Bredesen, D.E. (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262, 1274-1277

23. Åkerman, K.E., Wikström, M.K. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 68, 191-197

24. Andreyev, A.Y., Fahy, B., and Fiskum, G. (1998) Cytochrome c release from brain mitochondria is independent of the mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 439, 373-376

25. Fiskum, G., Craig, S.W., Decker, G.L., Lehninger, A.L. (1980) The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 3430-3434

26. Lenartowicz, E., Bernardi, P., and Azzone, G.F. (1991) Phenylarsine oxide induces the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23, 679-688

27. Petit, P.X., Goubert, M., Diolez, P., Susin, S.A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1998) Disruption of the outer mitochondrial membrane as a result of large amplitude swelling: the impact of irreversible permeability transition. *FEBS Lett.* 426, 111-116

28. Green, D.R., and Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312

29. Lehninger, A.L., Vercesi, A.E., and Bababunmi, E.A. (1978) Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1690-1694

30. Murphy, A.N., Mootha, V., Bredesen, D.E., and Fiskum, G. (1996) Effects of bcl-2 on mitochondrial Ca^{2+} uptake and proteolytic activity. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22, 464.8

31. Adams, J.M., and Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326

32. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., and Borner, C. (1998) Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499
33. Li, F., Srinivasan, A., Wang, Y., Armstrong, R.C., Tomaselli, K.J., and Fritz, L.C. (1997) Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 272, 30299-30305
34. Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J.C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4997-5002
35. Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., and Castilho, R.F. (1997) Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} : correlation with mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1318, 395-402
36. Zamzami, N., Marzo, I., Susin, S.A., Brenner, C., Larochette, N., Marchetti, P., Reed, J., Kofler, R., and Kroemer, G. (1998) The thiol crosslinking agent diamide overcomes the apoptosis-inhibitory effect of Bcl-2 by enforcing mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 16, 1055-1063
37. Wright, S.C., Wang, H., Wei, Q.S., Kinder, D.H., and Larrick, J.W. (1998) Bcl-2-mediated resistance to apoptosis is associated with glutathione-induced inhibition of AP24 activation of nuclear DNA fragmentation. *Cancer Res.* 58, 5570-5576

Figure Legends

Fig 1 - Effect of MPT inducers on PC12 mitochondrial membrane potential. PC12 cells ($2 \times 10^7/\text{ml}$) were incubated in standard reaction medium containing 5 μM safranin O and 8 μM Ca^{2+} in the absence (upper traces) or presence (lower panels) of 1 μM cyclosporin A (CsA). Where indicated, 0.01% digitonin (all lines), 200 μM *t*-bOOH (lines b), 15 μM PhAsO (lines c) and 1 μM FCCP (all traces) were added.

Fig. 2 - Effect of MPT inducers on GT1-7 mitochondrial membrane potential. GT1-7 cells ($2 \times 10^7/\text{ml}$) were incubated in standard reaction medium containing 5 μM safranin O and 20 μM Ca^{2+} in the absence (upper traces) or presence (lower panels) of 5 μM cyclosporin A (CsA). Where indicated, 0.01% digitonin (all lines), 200 μM *t*-bOOH (lines b), 15 μM PhAsO (lines c) and 1 μM FCCP (all traces) were added.

Fig. 3 - Electron microscopy of digitonin-permeabilized PC-12 cells under conditions leading to MPT. PC-12 cells were digitonin-permeabilized and incubated under the conditions for Fig. 1 for 30 min, in the presence of 8 μM Ca^{2+} (A and B), 8 μM Ca^{2+} plus 200 μM *t*-bOOH (C) or 8 μM Ca^{2+} and 15 μM PhAsO (D). Magnification: 3500 x (panels A) and 30000 x (panels B, C and D).

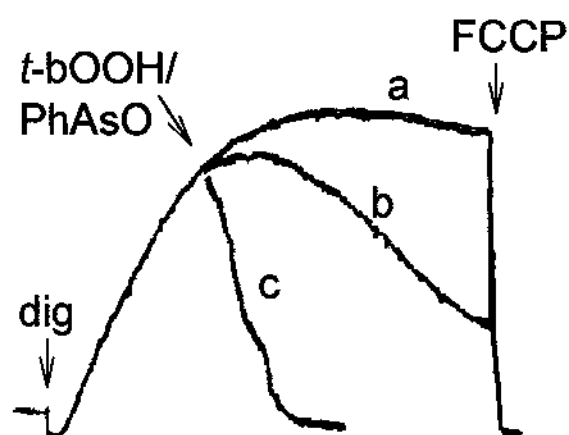
Fig. 4 - Cytochrome *c* release associated with MPT in PC-12 and GT1-7 cells. Supernatants of digitonin-permeabilized cell suspensions ($1.6 \times 10^8/\text{ml}$ for PC12 cells and $8 \times 10^7/\text{ml}$ for GT1-7 cells) incubated in conditions similar to Fig. 1 and 2 were submitted to immunoblotting for cytochrome *c* detection (see Materials and Methods).

Fig. 5 - Effect of Bcl-2 on *t*-bOOH and/or Ca^{2+} -induced pyridine nucleotide oxidation. PC12 cells ($2 \times 10^7/\text{ml}$) were incubated in standard reaction medium containing 0.01% digitonin and in the presence (lines a) or absence (lines b and c) of 1 μM rotenone. Where indicated, 8 μM Ca^{2+} (lines b and c), 200 μM *t*-bOOH (lines b), 800 μM *t*-bOOH (lines c) and 1 μM FCCP (all traces) were added.

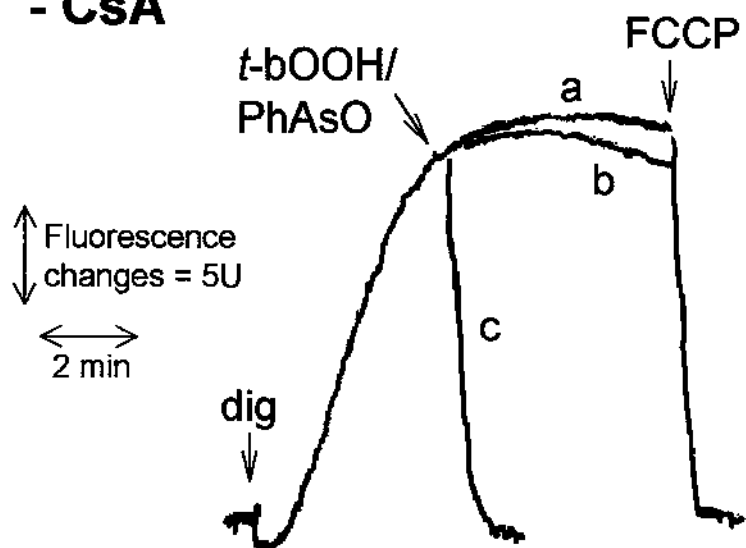
Fig. 6 - Effect of nucleotide redox state on MPT in PC12 cells. In the upper traces, PC12 cells ($2 \cdot 10^7/\text{ml}$) were incubated in standard reaction medium containing 5 μM safranin O and 8 μM Ca^{2+} in the presence (lines a) or absence (lines b-d) of 1 μM cyclosporin A (CsA). Where indicated, 0.01% digitonin (all lines), 200 μM *t*-bOOH (lines b), 400 μM *t*-bOOH (lines c), 800 μM *t*-bOOH (lines a and d) and 1 μM FCCP (all traces) were added. In the lower traces, PC12 cells ($2 \cdot 10^7/\text{ml}$) were incubated in standard reaction medium containing 5 μM safranin O and 8 μM Ca^{2+} . Where indicated, 0.01% digitonin (all lines), 2 μM PhAsO (lines b), 5 μM PhAsO (lines c), 10 μM PhAsO (lines d), 15 μM PhAsO (lines d) and 1 μM FCCP (all traces) were added.

Fig. 7 - Effect of nucleotide redox state on MPT in PC12 cells respiring on succinate. PC12 cells ($2 \cdot 10^7/\text{ml}$) were incubated in standard reaction medium containing 5 μM safranin O and 8 μM Ca^{2+} in the presence of 1 μM rotenone and 5 mM succinate. Where indicated, 0.01% digitonin (all lines), 200 μM *t*-bOOH (lines b and d), 800 μM *t*-bOOH (lines c and e) and 1 μM FCCP (all traces) were added. In lines d and e, malate and glutamate were omitted from the standard incubation medium.

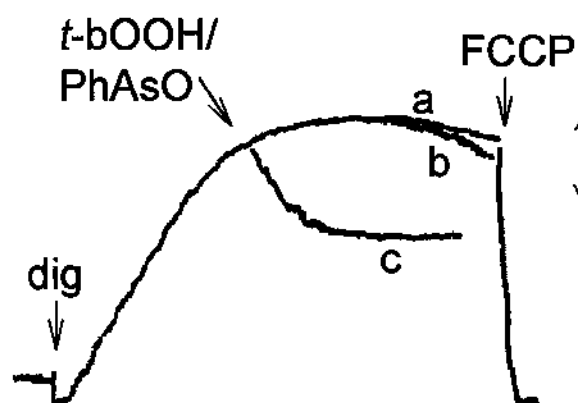
**Bcl-2(-)
- CsA**



**Bcl-2(+)
- CsA**



**Bcl-2(-)
+ CsA**



**Bcl-2(+)
+ CsA**

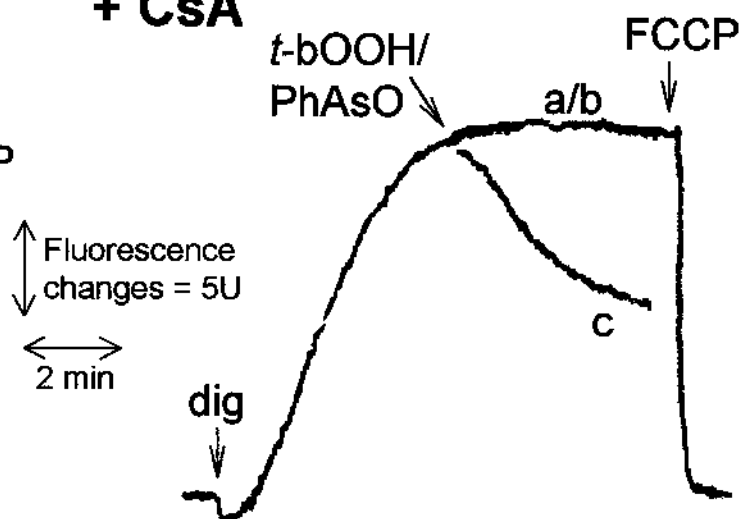


Fig. 1 - Kowaltowski *et al*, 1999

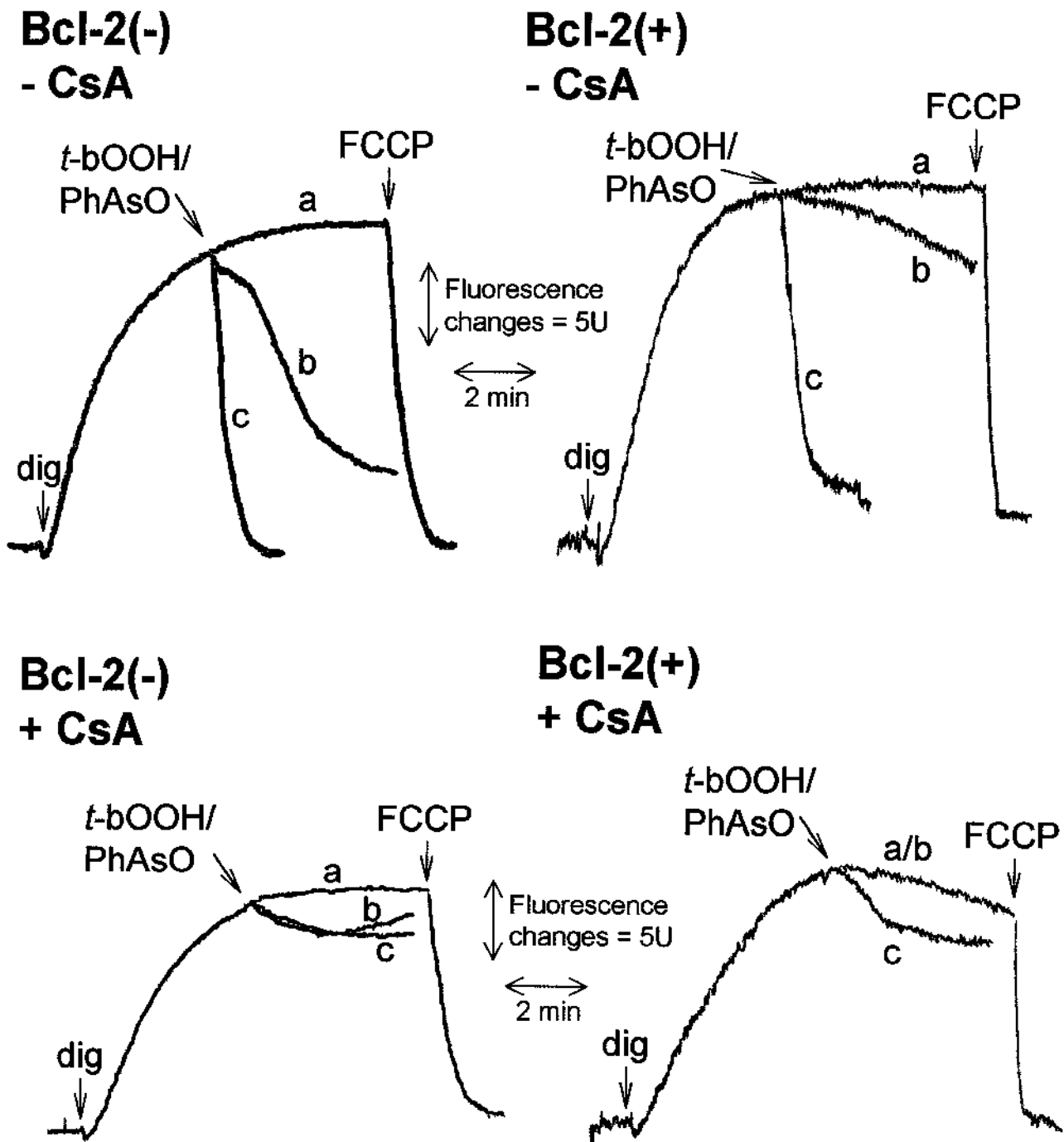


Fig. 2 - Kowaltowski *et al*, 1999

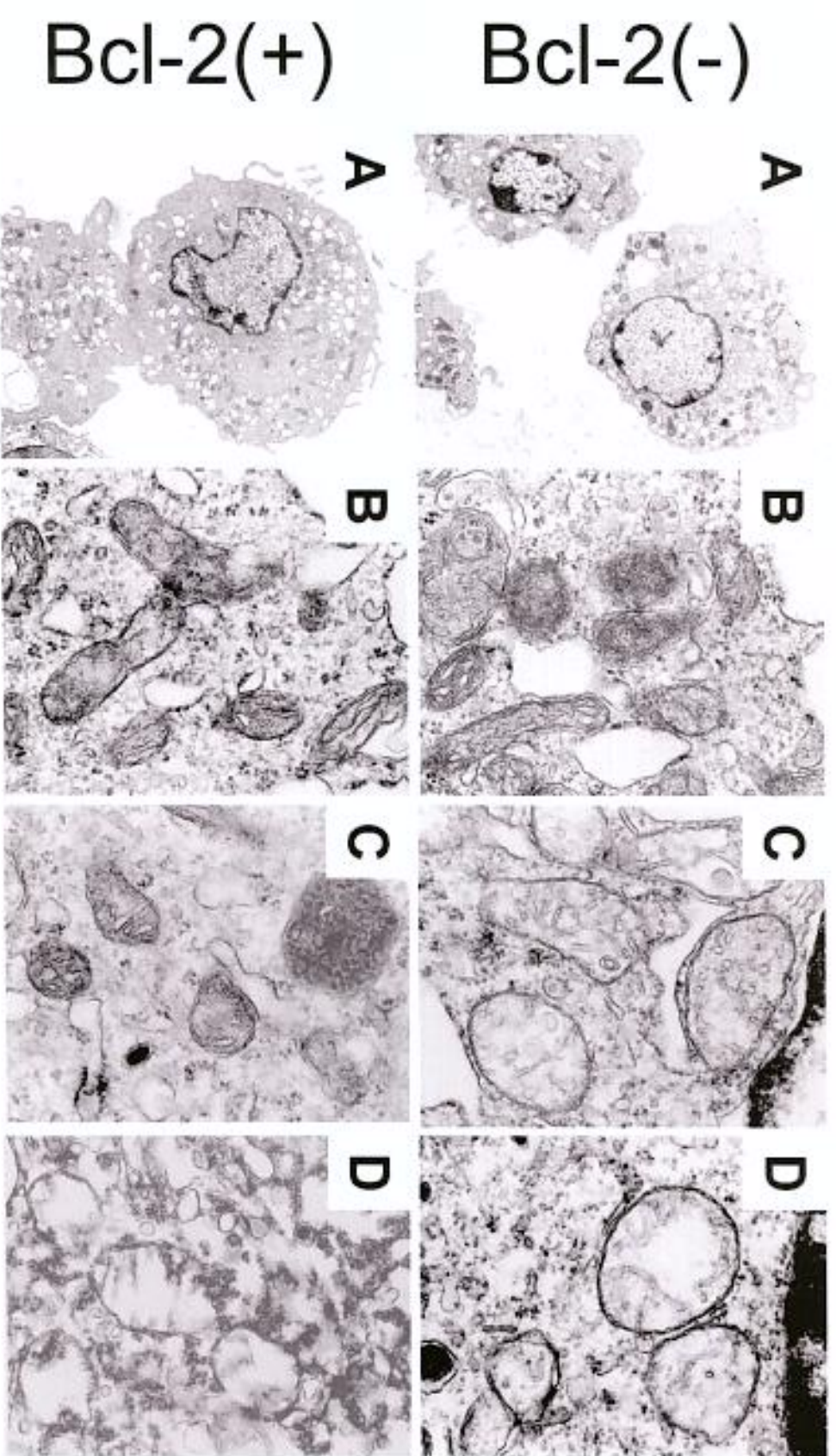


Fig. 3 - Kowaltowski *et al*, 1999

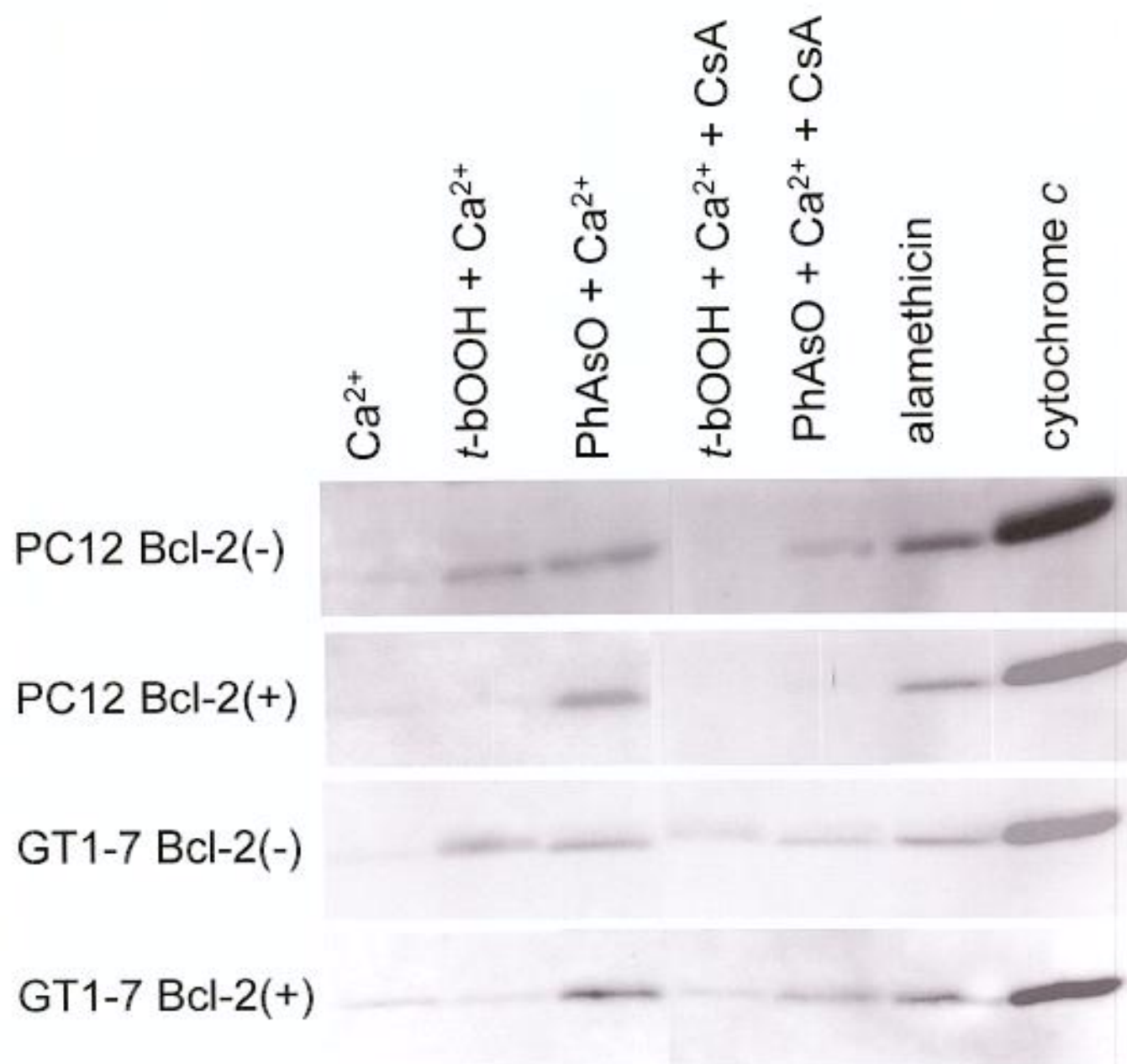
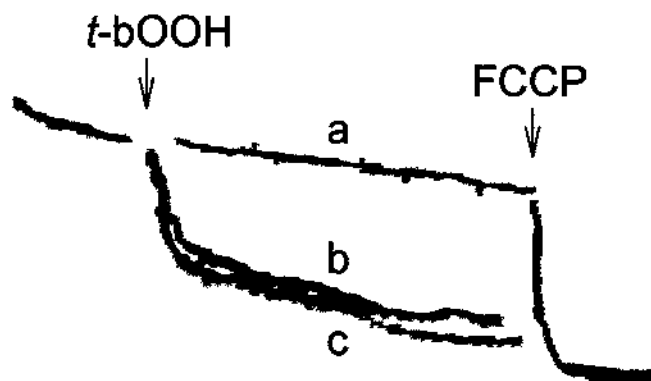


Fig. 4 - Kowaltowski *et al*, 1999

Bcl-2(-)



Bcl-2(+)

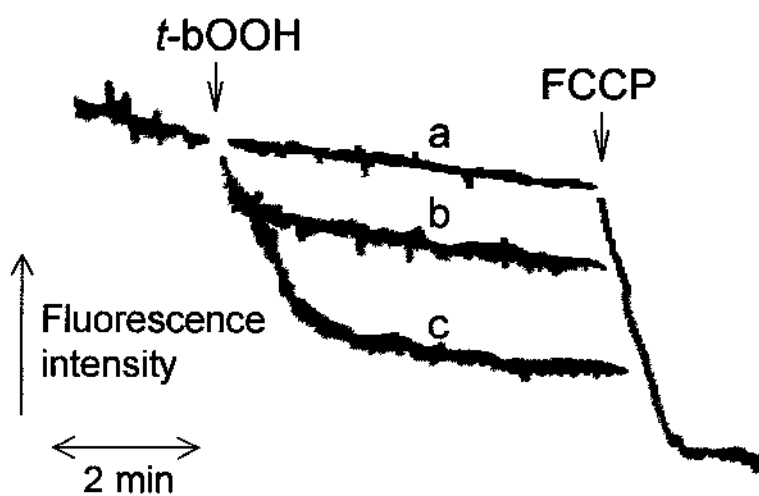


Fig. 5 - Kowaltowski *et al*, 1999

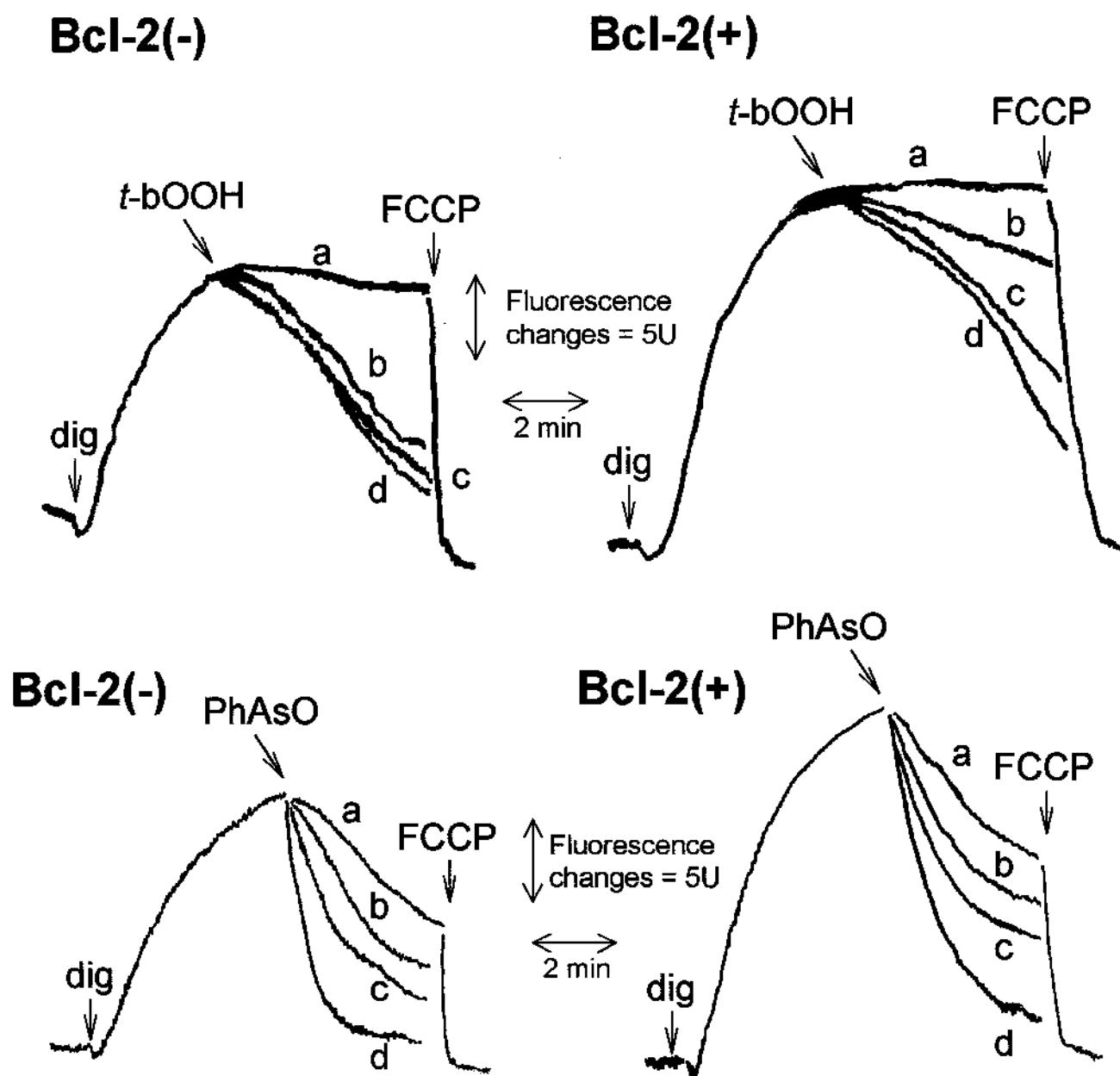


Fig. 6 - Kowaltowski *et al*, 1999

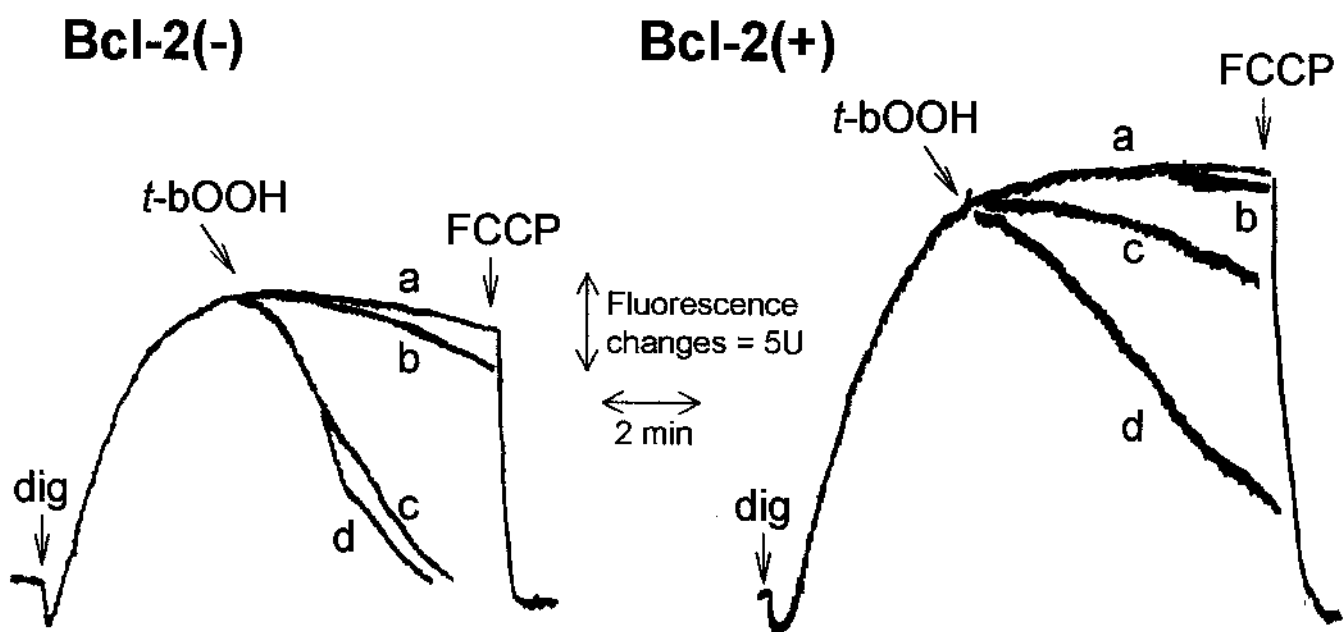


Fig. 7 - Kowaltowski *et al*, 1999

3.3.3. Discussão do 3º Trabalho

Nesse trabalho, demonstramos que a hiperexpressão de Bcl-2 em duas linhagens de células distintas é capaz de inibir a TPM induzida por *t*-butil hidroperóxido, mas não por óxido de fenilarsina. A TPM nessas condições foi caracterizada por uma queda do potencial de membrana (Fig. 1 e 2), inchamento (Fig. 3) e liberação de citocromo *c* mitocondrial para o meio de reação (Fig. 4). O *t*-butil hidroperóxido induz a TPM por oxidar nucleotídeos de piridina mitocondriais, levando a mitocôndria a uma condição de estresse oxidativo (veja item 1.5.), enquanto o óxido de fenilarsina promove a TPM diretamente, oxidando grupamentos tiólicos de proteínas da membrana mitocondrial interna (LENARTOWICZ *et al.*, 1991; KOWALTOWSKI *et al.*, 1997; KOWALTOWSKI & CASTILHO, 1997). Assim, desenvolvemos a hipótese de que a hiperexpressão de Bcl-2 previne o estresse oxidativo mitocondrial, baseados em estudos anteriores comprovando que o Bcl-2 aumenta o poder redutor celular (ELLERBY *et al.*, 1995)

Comprovando essa hipótese, notamos que a oxidação de NAD(P)H mitocondrial promovido por *t*-butil hidroperóxido era significativamente menor nas mitocôndrias Bcl-2(+) (Fig. 5). Isso pode se dever tanto ao maior conteúdo de NAD(P)H dessas mitocôndrias como ao maior potencial de membrana de mitocôndrias Bcl-2(+) (SHIMIZU *et al.*, 1998). Na presença de concentrações crescentes de *t*-butil hidroperóxido, era possível promover tanto a oxidação de NAD(P)H quanto a permeabilização mitocondrial nas células Bcl-2(+) (Fig. 6). Isso comprova que o principal mecanismo de ação do Bcl-2 é aumentar o poder redutor mitocondrial. Realmente, se aumentarmos o poder redutor de células Bcl-2(-), através do tratamento dessas células com rotenona na presença de

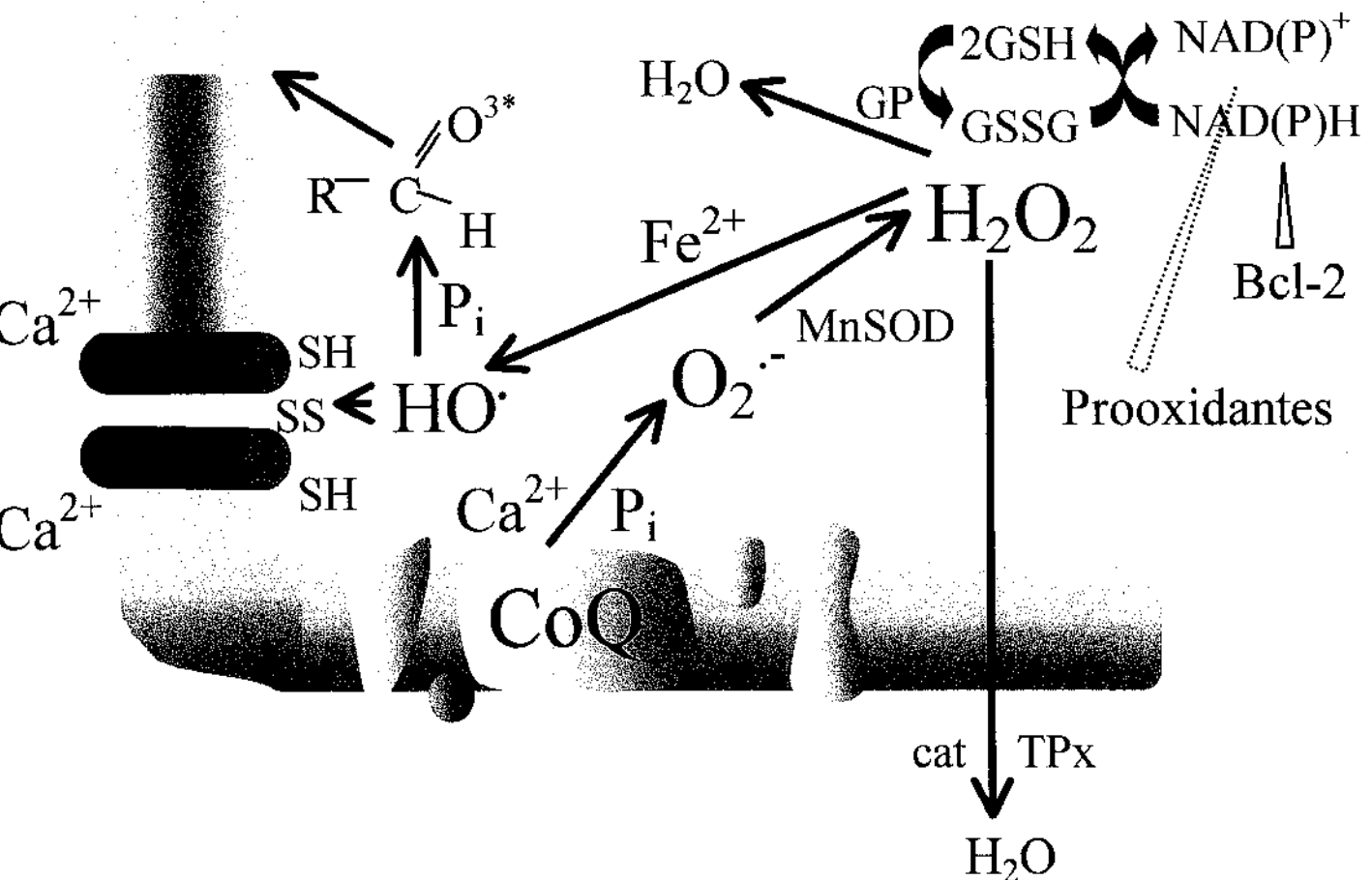
glutamato e malato, elas apresentam uma alta resistência à TPM induzida por *t*-butil hidroperóxido (Fig. 7), semelhantemente às células Bcl-2(+).

A constatação de que o aumento do poder redutor mitocondrial, e não a presença da proteína propriamente dita, é o principal mecanismo pelo qual o Bcl-2 previne a TPM é de grande relevância para o estudo de morte celular programada. Como demonstrado na Fig. 4 do presente trabalho, esse poder redutor aumentado na mitocôndria é capaz de inibir a liberação mitocondrial de citocromo *c* associado à TPM, que seria um dos principais mecanismos pelos quais o Bcl-2 inibe a apoptose (KROEMER *et al.*, 1998).

4. DISCUSSÃO GERAL

Nos trabalhos apresentados nessa tese, pudemos demonstrar que a TPM induzida por Ca^{2+} e P_i é induzida por EROs geradas pela própria mitocôndria. Um modelo esquemático do mecanismo pelo qual ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial interna nessas condições está apresentado no Esquema IV (página 85). Propomos que a geração de $\text{O}_2^{\cdot -}$ pela mitocôndria, aumentada pela presença de Ca^{2+} e P_i , resulta no acúmulo de H_2O_2 mitocondrial (veja 1º e 2º trabalho). Este H_2O_2 , na presença de íons Fe^{2+} , gera o $\text{HO}^{\cdot}$ (CASTILHO *et al.*, 1994), capaz de promover alterações oxidativas a grupamentos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial, que resultam na formação de um poro não específico, o poro da TPM. A abertura do poro da TPM, promovida por Ca^{2+} e regulada pela ciclofilina, resulta em permeabilização da membrana mitocondrial. A permeabilização da membrana mitocondrial nessas condições pode também ocorrer secundariamente à peroxidação lipídica da membrana mitocondrial interna, promovida por espécies excitadas triplete, cuja a formação é catalizada por P_i (veja 1º trabalho).

Pudemos também demonstrar que duas proteínas antiapoptóticas, a tioredoxina peroxidase e o Bcl-2, inibem a TPM por prevenir o estresse oxidativo mitocondrial. A tioredoxina peroxidase é capaz de remover o H_2O_2 mitocondrial acumulado, às custas de tióis reduzidos (NETTO *et al.*, 1996). O Bcl-2 promove uma maior resistência contra a oxidação de NAD(P)H , importante para a manutenção da capacidade redutora da glutathione peroxidase mitocondrial (veja item 1.5.). É possível que essa maior resistência à oxidação de NAD(P)H mitocondrial se deva ao maior potencial de membrana de mitocôndrias que hiperexpressam Bcl-2 (veja SHIMIZU *et al.*, 1998 e o 3º trabalho



IV – Transição de Permeabilidade Mitochondrial e Lipoperoxidação Secundários a Estresse Oxidativo Mitochondrial. A geração mitochondrial de $O_2^{\cdot-}$ ocorre principalmente no nível da coenzima Q (CoQ) da cadeia respiratória mitochondrial, estimulada por Ca^{2+} e P_i . O $O_2^{\cdot-}$ é dismutado pela MnSOD a H_2O_2 , que pode, na presença de Fe^{2+} , gerar $HO^{\cdot}$. O $HO^{\cdot}$ promove a oxidação de grupamentos tiólicos protéicos formando um poro não seletivo cuja abertura, estimulada por Ca^{2+} , resulta em TPM. Na presença de P_i , a oxidação de lipídeos da membrana mitochondrial interna pode gerar espécies tripletes, capazes de propagar reações de lipoperoxidação. Prooxidantes estimulam a geração de $HO^{\cdot}$ por impedir a detoxificação de H_2O_2 pela glutathiona peroxidase (GP), um efeito que é diminuído pela hiperexpressão de Bcl-2. O H_2O_2 pode também ser detoxificado por catalase (cat) ou tiorredoxina peroxidase (TPx) exógenos.

dessa tese), pois o potencial elétrico transmembrana mitocondrial é capaz de regular o estado redox do NAD(P)H (veja item 1.5.).

Anteriormente, já havia sido extensivamente demonstrado que MPT pode desencadear morte celular (KROEMER *et al.*, 1998; LEMASTERS *et al.*, 1998; HALESTRAP *et al.*, 1998). Quando ocorre TPM na maioria das mitocôndrias, de modo irreversível, é desencadeada a morte celular necrótica devido à depleção celular de ATP. Por outro lado, quando ocorre TPM em um número limitado de mitocôndrias, ou de modo reversível, a liberação de fatores pro-apoptóticos pela mitocôndria promove a morte celular apoptótica (LEMASTERS *et al.*, 1998 - veja item 1.7.). Outros estudos demonstraram que estresse oxidativo mitocondrial pode desencadear a morte celular (CASTILHO *et al.*, 1999; MURPHY *et al.*, 1998; LEMASTERS *et al.*, 1998). Aqui, mostramos a interação entre esses trabalhos, pois a TPM é uma consequência de estresse oxidativo mitocondrial.

Sabendo-se que a TPM é um fator desencadeante de morte celular, surge a possibilidade de inibir essa morte celular em situações em que é indesejada. Nesse intuito, já foi demonstrado que a ciclosporina A é capaz de prevenir a morte celular em situações patológicas com a isquemia/reperfusão (HALESTRAP *et al.*, 1998). Porém, como demonstramos aqui, a ciclosporina é capaz de prevenir a permeabilização mitocondrial associada à TPM, mas não o aumento de geração de H_2O_2 ou oxidação de grupamentos tiólicos protéicos (1º e 2º trabalhos; Castilho *et al.*, 1996). Também, a ciclosporina é incapaz de prevenir a permeabilização mitocondrial associada à lipoperoxidação da membrana mitocondrial interna. Essas alterações levam a uma diminuição irreversível da eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial (CASTILHO *et al.*, 1996; CASTILHO *et al.*, 1994) e podem promover lesões oxidativas de componentes extra-mitocondriais. Nesse sentido, foi demonstrado que o estresse oxidativo mitocondrial induzido por Ca^{2+} promove alterações de canais de Ca^{2+} da membrana plasmática, resultando em maior desregulação da homeostase de Ca^{2+} , que promove morte celular (BUDD & NICHOLLS, 1996). Em

concordância com os nossos resultados demonstrando que a ciclosporina não inibe o estresse oxidativo mitocondrial (1º e 2º trabalhos), a desregulação de Ca^{2+} tardia não pode ser prevenida por ciclosporina, mas sim por antioxidantes ou prevenindo-se a captação mitocondrial de Ca^{2+} (Castilho *et al.*, 1998b; 1999).

Como há alteração de função mitocondrial promovida por Ca^{2+} mesmo na presença de ciclosporina, propomos que o uso associado de ciclosporina e antioxidantes possa ser um modo mais eficaz de se prevenir a morte celular em condições que envolvem disfunção mitocondrial. Essas condições incluem tanto situações em que há quebra de homeostase celular de Ca^{2+} quanto condições que promovem estresse oxidativo mitocondrial, e participam de lesões teciduais que ocorrem em situações patológicas tão variadas quanto o acidente vascular cerebral, o infarto agudo do miocárdio, intoxicações, Síndrome de Rye e hemocromatose (veja LEMASTERS *et al.*, 1998).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, S.; CROSS, A.R.; BABIOR, B.M.; GOTTLEIB, R.A. - Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. **J. Biol. Chem.** 272:21878-21882, 1997.
- AUGUSTO, O. & BECHARA, E.J. - Hemin-catalyzed generation of triplet acetone. **Biochim. Biophys. Acta** 631:203-209, 1980.
- BACON, B.R. & BRITTON, R.S. - The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? **Hepatology** 11:125-137, 1990.
- BASSANI, R.A.; BASSANI, J.W.M.; BERS, D.M. - Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. **J. Physiol. Lond.** 453:591-608, 1992.
- BERLETT, B.S. & STADTMAN, E.R. - Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J. Biol. Chem.** 272:20313-20316, 1997.
- BERNARDES, C.F.; PEREIRA-DA-SILVA L.; VERCESI A.E. - t-Butylhydroperoxide-induced Ca^{2+} efflux from liver mitochondria in the presence of physiological concentrations of Mg^{2+} and ATP. **Biochim. Biophys. Acta** 850:41-48, 1986.
- BERNARDES, C.F.; MEYER-FERNANDES, J.R.; BASSERES, D.S.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. - Permeabilization of the rat liver inner membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) in the presence of Ca^{2+} is mediated by production of membrane protein aggregates. **Biochim. Biophys. Acta** 1188:93-100, 1994.
- BERNARDI, P. - Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient: evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. **J. Biol. Chem.** 267:8834-8839, 1992.
- BERNARDI, P. - The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. **Biochim. Biophys. Acta.** 1275:5-9, 1996.

- BERNARDI, P. & PETRONILLI, V. - The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. **J. Bioenerg. Biomembr.** 28:131-138, 1996.
- BERRIDGE, M.J. - Inositol triphosphate and calcium signalling. **Nature** 361:315-325 1993.
- BOBYLEVA, V.; PAZIENZA, T.L.; MASEROLI, R.; TOMASI, A.; SALVIOLI, S.; COSSARIZZA, A.; FRANCESCHI, C.; SKULACHEV, V.P. - Decrease in mitochondrial energy coupling by thyroid hormones: a physiological effect rather than a pathological hyperthyroidism consequence. **FEBS Lett.** 430:409-413, 1998.
- BOLLI, R. - Causative role of oxyradicals in myocardial stunning: a proven hypothesis. A brief review of the evidence demonstrating a major role of reactive oxygen species in several forms of postischemic dysfunction. **Basic Res. Cardiol.** 93:156-162, 1998.
- BOLLI, R.; PATEL, B.S.; JEROUDI, M.O.; LAI, E.K.; MCCAY P.B. - Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. **J. Clin. Invest.** 82:476-485, 1988.
- BOLLI, R.; JEROUDI, M.O.; PATEL, B.S.; ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; LAI, E.K.; MCCAY, P.B. - Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. **Circ. Res.** 65:607-622, 1989.
- BOVERIS, A. & CHANCE, B. - The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.** 134:707-716, 1973.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E.; STOPPANI, A.O. - Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem. J.** 156:435-44, 1976.
- BRITTON, R.S. - Metal-induced hepatotoxicity. **Semin. Liver Dis.** 16:3-12, 1996.
- BRUSTOVETSKY, N. & KLINGENBERG, M. - Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca^{2+} . **Biochemistry** 35:8483-8488, (1996).
- BUDD, S.L. & NICHOLLS, D.G. - A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca^{2+} homeostasis. **J. Neurochem.** 66:403-411, 1996a.

- BUDD, S.L. & NICHOLLS, D.G. - Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **J. Neurochem.** 67:2282-2291, 1996b.
- BUDD, S.L.; CASTILHO, R.F.; NICHOLLS, D.G. - Mitochondrial membrane potential and hydroethidine-monitored superoxide generation in cultured cerebellar granule cells. **FEBS Lett.** 415:21-24, 1997.
- CADENAS, E.; BOVERIS, A.; RAGAN, C.I.; STOPPANI, A.O.M. - Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.** 180:248-257, 1977.
- CADET, J.L. & BRANNOCK, C. - Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. **Neurochem. Int.** 32:117-131, 1998.
- CAI, J. & JONES, D.P. - Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. **J. Biol. Chem.** 273:11401-11404, 1998.
- CARAFOLI, E. - Intracellular calcium homeostasis. **Ann. Rev. Biochem.** 56:395-433, 1987.
- CASTILHO, R.F.; MEINICKE, A.R.; ALMEIDA, A.M.; HERMES-LIMA, M.; VERCESI, A.E. - Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate is potentiated by Ca^{2+} and includes lipid peroxidation and alterations in membrane proteins. **Arch. Biochem. Biophys.** 308:158-163, 1994.
- CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; VERCESI, A.E. - Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or t-butyl hydroperoxide in the presence of Ca^{2+} : effect of coenzyme Q redox state. **Free Radical Biol. Med.** 18:55-59, 1995a.
- CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; MEINICKE, A.R.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. - Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species. **Free Radical Biol. Med.** 18:479-486, 1995b.
- CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. - The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by

- the extent of membrane protein thiol cross-linking. **J. Bioenerg. Biomembr.** 28:523-529, 1996.
- CASTILHO, R.F.; KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. - 3,5,3'-Triiodothyronine induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species and membrane protein thiol oxidation. **Arch. Biochem. Biophys.** 354:151-157, 1998a.
- CASTILHO, R.F.; HANSSON, O.; WARD, M.W.; BUDD, S.L.; NICHOLLS, D.G. - Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **J. Neurosci.** 18:10277-10286, 1998b.
- CASTILHO, R.F.; WARD, M.W.; NICHOLLS, D.G. - Oxidative stress, mitochondrial function, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. **J. Neurochem.** 72:1394-1401, 1999.
- COBBOLD, P.H. & RINK, T.J. - Fluorescence and bioluminescence measurement of cytosolic free calcium. **Biochem. J.** 248:313-328, 1987.
- COSTA, L.E.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. - Active oxygen species in the liver of rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. **Am. J. Physiol.** 264:1395-1400, 1993.
- DAWSON, T.L.; GORES, G.J.; NIEMINEN, A.L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. - Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. **Am. J. Physiol.** 264:961-967, 1993.
- DE MEIS, L. & VIANNA, A.L. - Energy interconversion by the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. **Ann. Rev. Biochem.** 48:275-292, 1979.
- DEGLI ESPOSTI, M. & MCLENNAN, H. - Mitochondria and cells produce reactive oxygen species in virtual anaerobiosis: relevance to ceramide-induced apoptosis. **FEBS Lett.** 430:338-342, 1998.
- DOONAN, S.; BARRA, D.; BOSSA, F. - Structural and genetic relationships between cytosolic and mitochondrial isoenzymes. **Int. J. Biochem.** 16:1193-1199, 1984.
- DRUMMOND, R.M. & TUFT, R.A. - Release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum increases mitochondrial $[\text{Ca}^{2+}]$ in rat pulmonary artery smooth muscle cells. **J. Physiol. (Lond)** 516:139-147, 1999.
- DUBINSKY, J.M. & LEVI, Y. - Calcium-induced activation of the mitochondrial permeability transition in hippocampal neurons. **J. Neurosci. Res.** 53:728-741, 1998.

- DUKE, R.C.; OJCIUS, D.M.; YOUNG, J.D. - Cell suicide in health and disease. **Sci. Am.** Dec. 1996:48-55, 1996.
- DURANTEAU, J.; CHANDEL, N.S.; KULISZ, A.; SHAO, Z.; SCHUMACKER, P.T. - Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. **J. Biol. Chem.** 273:11619-11624, 1998.
- ERNSTER, L.; FORSMARK, P.; NORDENBRAND, K. - The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. **J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)** 1992:548-551, 1992.
- FAGIAN, M.M.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; VERCESI, A.E. - Inhibition of oxidative phosphorylation by Ca^{2+} or Sr^{2+} : competition with Mg^{2+} in the formation of adenine nucleotide complexes. **Biochim. Biophys. Acta** 852:262-268, 1986.
- FAGIAN, M.M.; PEREIRA-DA-SILVA, L.; MARTINS, I.S.; VERCESI, A.E. - Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. **J. Biol. Chem.** 265:19955-19960, 1990.
- FISKUM, G.; CRAIG, S.W.; DECKER, G.L.; LEHNINGER, A.L. - The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 77:3430-3434, 1980.
- FISKUM, G.; MURPHY, A.N.; BEAL, M.F. - Mitochondria in neurodegeneration. Part II: Acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. **J. Cerebr. Flow Met.** 19:351-369, 1998.
- GABBITA, S.P.; SUBRAMANIAM, R.; ALLOUCH, F.; CARNEY, J.M.; BUTTERFIELD, D.A. - Effects of mitochondrial respiratory stimulation on membrane lipids and proteins: an electron paramagnetic resonance investigation. **Biochim. Biophys. Acta** 1372:163-173, 1998.
- GIULIVI, C.; BOVERIS, A.; CADENAS, E.A. - Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxyguanosine in mitochondrial DNA. **Arch. Biochem. Biophys.** 316:909-916, 1995.

- GIULIVI, C.; PODEROSO, J.J.; BOVERIS, A. - Production of nitric oxide by mitochondria. **J. Biol. Chem.** 273:11038-11043, 1998.
- GRAY, M.W.; BURGER, G.; LANG, B.F. - Mitochondrial evolution. **Science** 283:1476-1481, 1999.
- GREEN, D.R. & REED, J.C. - Mitochondria and apoptosis. **Science** 281:1309-1312, 1998.
- GRIFFITHS, E.J. & HALESTRAP, A.P. - Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischemia, but open upon reperfusion. **Biochem. J.** 307:93-98, 1995.
- GRIJALBA, M.T.; VERCESI, A.E.; SCHREIER, S. - Ca^{2+} -induced lipid phase separations in submitochondrial particles. Correlation with Ca^{2+} -stimulated reactive oxygen species generation by the mitochondrial respiratory chain. XXV Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Caxambu, MG, Brazil, May 4-7, 1995. (Abstract)
- GRIJALBA, M.T.; ANDRADE, P.B.; MEINICKE, A.R.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E.; SCHREIER, S. - Inhibition of membrane lipid peroxidation by a radical scavenging mechanism: a novel function for hydroxyl-containing ionophores. **Free Rad. Res.** 28:301-318, 1998.
- GUNASEKAR, P.G.; KANTHASAMY, A.G.; BOROWITZ, J.L.; ISOM, G.E. - NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. **J. Neurochem.** 65:2016-2021, 1995.
- GUNTER, T.E. & PFEIFFER, D.R. - Mechanism by which mitochondria transport calcium. **Am. J. Physiol.** 258:C755-C786, 1990.
- GUNTER, T.E.; GUNTER, K.K.; SHEU, S.-S.; GAVIN, C.E. - Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.** 267:C313-C339, 1994.
- HALESTRAP, A.P.; KERR, P.M.; JAVADOV, S.; WOODFIELD, K.Y. - Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. **Biochim. Biophys. Acta** 1366:79-94, 1998.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. - Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Meth. Enzymol.** 186:1-85, 1990.

- HANSFORD, R.G. - Dehydrogenase activation by Ca^{2+} in cells and tissues. **J. Bioenerg. Biomembr.** 23:823-854, 1991.
- HANSFORD, R.G.; HOGUE, B.A.; MILDAZIENE, V. - Dependence of H_2O_2 formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. **J. Bioenerg. Biomembr.** 29:89-95, 1997.
- HARRIS, E.J.; AL-SHAIKHALY, M.; BAUM, H. - Stimulation of mitochondrial calcium ion efflux by thiol-specific reagents and by thyroxine. The relationship to adenosine diphosphate retention and to mitochondrial permeability. **Biochem. J.** 182:455-464, 1979.
- HAWORTH, R.A. & HUNTER, D.R. - The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. **Arch. Biochem. Biophys.** 195:460-467, 1979.
- HOEK, J.B. & RYDSTRON, J. - Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. **Biochem. J.** 254:1-10, 1988.
- HUNTER, D.R. & HAWORTH, R.A. - The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. **Arch. Biochem. Biophys.** 195:453-459, 1979a.
- HUNTER, D.R. & HAWORTH, R.A. - The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca^{2+} release. **Arch. Biochem. Biophys.** 195:468-477, 1979b.
- JAMIESON, D.; CHANCE, B.; CADENAS, E.; BOVERIS, A. - The relation of free radical production to hyperoxia. **Annu. Rev. Physiol.** 48:703-719, 1986.
- JUURLINK, B.H. & SWEENEY, M.I. - Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 21:121-128, 1997.
- KAPPUS, H. - Lipid peroxidation: Mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In **Oxidative Stress** (Ed. H. Sies), Academic Press, London, 1985, p.273-310.
- KLUCK, R.M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D.R.; NEWMAYER, D.D. - The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science** 275:1132-1136, 1997.

- KORSHUNOV, S.S.; SKULACHEV, V.P.; STARKOV, A.A. - High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Lett.** 416:15-18, 1997.
- KORSHUNOV, S.S.; KORKINA, O.V.; RUUGE, E.K.; SKULACHEV, V.P.; STARKOV, A.A. - Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O_2^- and H_2O_2 by mitochondria in the resting state. **FEBS Lett.** 435:215-218, 1998.
- KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. - Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. **Am. J. Physiol.** 269:C141-C147, 1995.
- KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. -Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett.** 378:150-152, 1996.
- KOWALTOWSKI, A.J.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. - Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. **FEBS Lett.** 425:213-216, 1998a.
- KOWALTOWSKI, A.J.; NAIA-DA-SILVA, E.S.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. - Ca^{2+} -stimulated mitochondrial reactive oxygen species generation and permeability transition are inhibited by dibucaine or Mg^{2+} . **Arch. Biochem. Biophys.** 359:77-81, 1998b.
- KOWALTOWSKI, A.J. & VERCESI, A.E. - Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** 26:463-471, 1999.
- KRISTIAN, T. & SIESJO, B.K. - Calcium in ischemic cell death. **Stroke** 29:705-718, 1998.
- KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. - The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu. Rev. Physiol.** 60:619-642, 1998.
- LEHNINGER, A.L.; VERCESI, A.E.; BABABUNMI, E.A. - Regulation of Ca^{2+} release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 75:1690-1694, 1978.
- LEMASTERS, J.J. & NIEMINEN, A.-L. - Mitochondrial oxygen radical formation during reductive and oxidative stress to intact hepatocytes. **Biosc. Rep.** 17:281-291, 1997.

- LEMASTERS, J.J.; NIEMINEN, A.L.; QIAN, T.; TROST, L.C.; ELMORE, S.P.; NISHIMURA, Y.; CROWE, R.A.; CASCIO, W.E.; BRADHAM, C.A.; BRENNER, D.A.; HERMAN, B. - The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochim. Biophys. Acta.** 1366:177-196, 1998.
- LENARTOWICS, E.; BERNARDI, P.; AZZONE, G.F. - Phenylarsine oxide induced the cyclosporin A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. **J. Bioenerg. Biomembr.** 23:679-688, 1991.
- LIU, S.S. - Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. **Biosc. Rep.** 17:259-272, 1997.
- LOSCHEN, G.; AZZI, A.; FLOHE, L. - Mitochondrial H₂O₂ formation: relationship with energy conservation. **FEBS Lett.** 33:84-87, 1973.
- LOSCHEN, G. & AZZI, A. - On the formation of hydrogen peroxide and oxygen radicals in heart mitochondria. **Recent Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab.** 7:3-12, 1975.
- LUBEC, G. - The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. **J. Investig. Med.** 44:324-346, 1996.
- MEINICKE, A.R.; BECHARA, E.J.; VERCESI, A.E. - Ruthenium red-catalyzed degradation of peroxides can prevent mitochondrial oxidative damage induced by either tert-butyl hydroperoxide or inorganic phosphate. **Arch. Biochem. Biophys.** 349:275-280, 1998.
- MERRYFIELD, M.L. & LARDY, H.A. - Ca²⁺-mediated activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase occurs via release of FeII from rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.** 257:3628-3635, 1982.
- MULTHAUP, G.; RUPPERT, T.; SCHLICKSUPP, A.; HESSE, L.; BEHER, D.; MASTERS, C.L. - Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. **Biochem. Pharmacol.** 54:533-539, 1997.
- MURPHY, A.N.; BREDESEN, D.E.; CORTOPASSI, G.; WANG, E.; FISKUM, G. - Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neuronal cell mitochondria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93:9892-9898, 1996.

- MURPHY, A.N.; FISKUM, G.; BEAL, M.F. - Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 19:231-245, 1999.
- MYERS, K.M.; FISKUM, G.; LIU, Y.; SIMMENS, S.J.; BREDESEN, D.E.; MURPHY, A.N. - Bcl-2 protects neural cells from cyanide/aglycemia-induced lipid oxidation, mitochondrial injury, and loss of viability. **J. Neurochem.** 65:2432-2440, 1995.
- NANTES, I.L.; CILENTO, G.; BECHARA, E.J.H.; VERCESI, A.E. - Chemiluminescent diphenylacetaldehyde oxidation by mitochondria is promoted by cytochromes and leads to oxidation injury of the organelle. **Photochem. Photobiol.** 62:522-527, 1995.
- NAZARETH, W.; NASSER, Y.; CROMPTON, M. - Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 23:1351-1354, 1991.
- NÈGRE-SALVAYRE, A.; HIRTZ, C.; CARRERA, G.; CAZENAVE, R.; TROLY, M.; SALVAYRE, R.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA, L. - A role for the uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. **FASEB J.** 11:809-815, 1997.
- NETTO, L.E.S.; CHAE, H.Z.; KANG, S.W.; RHEE, S.G.; STADTMAN, E.R. - Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. **J. Biol. Chem.** 271:15315-15321, 1996.
- NICHOLLS, D.G. - Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. **Biochem. J.** 170:511-522, 1978.
- NICHOLLS, D.G. & FERGUSON, S.J. - **Bioenergetics 2**. Academic Press Inc. London, UK, 1982.
- NICOTERA, P.; BELLOMO, G.; ORRENIUS, S. - The role of Ca^{2+} in cell killing. **Chem. Res. Toxicol.** 3:484-494, 1990.
- PASTORINO, J.G.; SNYDER, J.W.; SERRONI, A.; HOEK, J.B.; FARBER, J.L. - Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of culture hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. **J. Biol. Chem.** 268:13791-13798, 1993.

- PETIT, P.X.; SUSIN, S.-A.; ZAMZAMI, N.; MIGNOTTE, B.; KROEMER, G. - Mitochondria and programmed cell death: back to the future. **FEBS Lett.** 396:7-13, 1996.
- PINTON, P.; BRINI, M.; BASTIANUTTO, C.; TUFT, R.A.; POZZAN, T.; RIZZUTO, R. - New light on mitochondrial calcium. **Biofactors** 8:243-253, 1998.
- POLYAK, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J.L.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. - A model for p53-induced apoptosis. **Nature** 389:300-305, 1997.
- PRYOR, W.A. & SQUADRITO, G.L. - The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **Am. J. Physiol.** 268:699-722, 1995.
- RADI, R.; TURRENS, J.F.; CHANG, L.Y.; BUSH, K.M.; CRAPO, J.D.; FREEMAN, B.A. - Detection of catalase in rat heart mitochondria. **J. Biol. Chem.** 266:22028-22034, 1991.
- REED, J.C.; JURGENSMEIER, J.M.; MATSUYAMA, S. - Bcl-2 family proteins and mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** 1366:127-137, 1998.
- REED, K.C. & BYGRAVE, F.L. - Inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. **Biochem. J.** 140:143-155, 1974.
- REYNOLDS, I.J. & HASTINGS, T.G. - Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. **J. Neurosci.** 15:3318-3327, 1995.
- RICHTER, C. - Pro-oxidants and mitochondrial Ca^{2+} : their relationship to apoptosis and oncogenesis. **FEBS Letts.** 325:104-107, 1993.
- RIGOBELLO, M.P.; CALLEGARO, M.T.; BARZON, E.; BENETTI, M.; BINDOLI, A. - Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the redox regulation of membrane permeability. **Free Radic. Biol. Med.** 24:370-376, 1998.
- ROSSI, C.S. & LEHNINGER, A.L. - Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca^{++} and phosphate and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.** 239:3971-3980, 1964.
- SALGANIK, R.I.; SHABALINA, I.G.; SOLOVYOVA, N.A.; KOLOSOVA, N.G.; SOLOVYOV, V.N.; KOLPAKOV, A.R. - Impairment of respiratory functions in

- mitochondria of rats with an inherited hyperproduction of free radicals. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 205:180-185, 1994.
- SCARLETT, J.L. & MURPHY, M.P. - Release of apoptogenic proteins from the mitochondrial intermembrane space during the mitochondrial permeability transition. **FEBS Lett.** 418:282-286, 1997.
- SHIMIZU, S.; EGUCHI, Y.; KAMIIKE, W.; FUNAHASHI, Y.; MIGNON, A.; LACRONIQUE, V.; MATSUDA, H.; TSUJIMOTO, Y. - Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 95:1455-1459, 1998.
- SIES, H. & MOSS, K.M. - A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. **Eur. J. Biochem.** 84:377-383, 1978.
- SIES, H. - Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Radic. Biol. Med.** 14:313-323, 1993.
- SKULACHEV, V.P. - Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. **FEBS Lett.** 397:7-10, 1996.
- SKULACHEV, V.P. - Membrane-linked systems preventing superoxide formation. **Biosci. Rep.** 17:347-366, 1997.
- SKULACHEV, V.P. - Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. **FEBS Lett.** 423:275-280, 1998.
- SORRENTINO, V. & VOLPE, P. - Ryanodine receptors: how many, where and why? **Trends Pharmacol. Sci.** 14:98-103, 1993.
- STELLER, H. - Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science** 267:1445-1449, 1995.
- SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; CASTEDO, M.; HIRSCH, T.; MARCHETTI, P.; MACHO, A.; DAUGAS, E.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. - Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. **J. Exp. Med.** 184:1331-1341, 1996.
- SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. - Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim. Biophys. Acta** 1366:151-165, 1998.

- SUSIN, S.A.; LORENZO, H.K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B.E.; BROTHERS, G.M.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; COSTANTINI, P.; LOEFFLER, M.; LAROCLETTE, N.; GOODLETT, D.R.; AEBERSOLD, R.; SIDEROVSKI, D.P.; PENNINGER, J.M.; KROEMER, G. - Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature** 397:441-446, 1999.
- SUTTON, H.C. & WINTERBOURN, C.C. - On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. **Free Radic. Biol. Med.** 6:53-60, 1989.
- TATOYAN, A. & GIULIVI, C. - Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.** 273:11044-11048, 1998.
- TRUMP, B.F. & BEREZESKY, I.K. - Calcium-mediated cell injury and cell death. **FASEB. J.** 9:219-228, 1995.
- TURRENS, J.F. - Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosc. Rep.** 17:3-8, 1997.
- TURRENS, J.F. & BOVERIS, A. - Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem. J.** 191:421-427, 1980.
- TURRENS, J.F.; FREEMAN, B.A.; LEVITT, J.G.; CRAPO, J.D. - The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. **Arch. Biochem. Biophys.** 217:401-410, 1982.
- TURRENS, J.F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A.L. - Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.** 237:408-414, 1985.
- VALLE, V.G.R.; FAGIAN, M.M.; PARENTONI, L.S.; MEINICKE, A.R.; VERCESI, A.E. - The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization. **Arch. Biochem. Biophys.** 307:1-7, 1993.
- VANDEN HOEK, T.L.; BECKER, L.B.; SHAO, Z.; LI, C.; SCHUMACKER, P.T. - Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. **J. Biol. Chem.** 273:18092-18098, 1998.

- VERCESI, A.E. - Possible participation of membrane thiol groups on the mechanism of NAD(P)⁺-stimulated Ca²⁺ efflux from mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 119:305-310, 1984.
- VERCESI, A.E.; KOWALTOWSKI, A.J.; GRIJALBA, M.T.; MEINICKE, A.R.; CASTILHO, R.F. - The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosc. Rep.** 17:43-52, 1997.
- VISIOLI, O. - Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. **Eur. Heart J.** 19B:2-11, 1998.
- WATABE, S.; HIROI, T.; YAMAMOTO, Y.; FUJIOKA, Y.; HASEGAWA, H.; YAGO, N.; TAKAHASHI, S.Y. - SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. **Eur. J. Biochem.** 249:52-60, 1997.
- XIE, Y.W.; KAMINSKI, P.M.; WOLIN, M.S. - Inhibition of rat cardiac muscle contraction and mitochondrial respiration by endogenous peroxynitrite formation during posthypoxic reoxygenation. **Circ. Res.** 82:891-897, 1998.
- YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C.N.; IBRADO, A.M.; CAI, J.; PENG, T.I.; JONES, D.P.; WANG, X. - Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science** 275:1129-1132, 1997.
- YANG, W. & BLOCK, E.R. - Effect of hypoxia and reoxygenation on the formation and release of reactive oxygen species by porcine pulmonary artery endothelial cells. **J. Cell Physiol.** 164:414-423, 1995.
- ZAKOWSKI, J.J. & TAPPEL, A.L. - Purification and properties of rat liver mitochondrial glutathione peroxidase. **Biochim. Biophys. Acta** 526:65-76, 1978.
- ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A.; MARCHETTI, T.; HIRSCH, T.; GÓMEZ-MONTERREY, I.; CASTELO, M.; KROEMER, G. - Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **J. Exp. Med.** 183:1533-1544, 1996.
- ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; DALLAPORTA, B.; PETIT, P.X.; KROEMER, G. - Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. **J. Bioenerg. Biomembr.** 29:185-193, 1997.

- ZHANG, P.; LIU, B.; KANG, S.W.; SEO, M.S.; RHEE, S.G.; OBEID, L.M. - Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. **J. Biol. Chem.** 272:30615-30618, 1997.
- ZHIVOTOVSKI, B.; ORRENIUM, S.; BRUSTUGUN, O.T.; DØSKELAND, S.O. - Injected cytochrome c induces apoptosis. **Nature** 391:449-450, 1998.
- ZORATTI, M. & SZABÒ, I. - The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta** 1241:139-176, 1995.
- ZWICKER, K.; DIKALOV, S.; MATUSCHKA, S.; MAINKA, L.; HOFMANN, M.; KHRAMTSOV, V.; ZIMMER, G. - Oxygen radical generation and enzymatic properties of mitochondria in hypoxia/reoxygenation. **Arzneimittelforschung** 48:629-636, 1998.

6. APÊNDICE

CURRICULUM VITAE

ALICIA JULIANA KOWALTOWSKI

A) DADOS PESSOAIS

Nascimento: 2 de abril de 1974 - São Paulo, SP, Brasil
 Endereço: R. Cássia, 417, Condomínio Rio das Pedras
 13081-970 Campinas, SP, Brasil
 Estado civil: solteira
 Endereço de trabalho: Departamento de Patologia Clínica
 Faculdade de Ciências Médicas
 Universidade Estadual de Campinas
 13083-970 Campinas, SP, Brasil
 Fone: (019) 788 1120
 e-mail: alicia@obelix.unicamp.br
 Fone residencial: (019) 287-4535

B) ESCOLARIDADE

	1º Grau
1981-1983	Escola Americana de Campinas - EAC
1983-1985	Colégio Notre Dame de Campinas
1985-1986	Clairmont Primary School - Decatur, GA, EUA
1986- 1988	Colégio Notre Dame de Campinas
1989-1991	2º Grau
	Curso Técnico Profissionalizante em Bioquímica
	Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado - ETECAP
	Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza - CEETEPS
1992 - 1997	Graduação em Medicina
	Faculdade de Ciências Médicas - FCM
	Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
1998 -1999	Pós-Graduação em Ciências Médicas - Ciências Biomédicas (em curso)
	Faculdade de Ciências Médicas - FCM
	Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

C) AUXÍLIOS RECEBIDOS

Bolsa de Iniciação Científica IC-CNPq/UNICAMP

Orientador: Prof. Dr. Anibal E. Vercesi (Depto. Bioquímica, IB, UNICAMP)

(junho/1993 - março/1996) - Processo nº 500 64090-4

Bolsa de Iniciação Científica FAPESP

Orientador: Prof. Dr. Anibal E. Vercesi (Depto. Patologia Clínica, FCM, UNICAMP)

(agosto/96-novembro/97) - Processo nº 96/4235-5

Uso de Reserva Técnica para Estágio no Exterior (FAPESP)

Orientador: Prof. Dr. Gary Fiskum (Dep. Anesthesiology, University of Maryland, USA)

(agosto/98-fevereiro/99) - Processo nº 97/09651-0

Bolsa de Doutorado FAPESP

Orientador: Prof. Dr. Anibal E. Vercesi (Depto. Patologia Clínica, FCM, UNICAMP)

(março/98-atual) - Processo nº 97/09651-0

D) ESTÁGIOS REALIZADOS

1- Dr. Bessie F. Lawrence 24th International Summer Science Institute (1992),

Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel

Bolsa cedida por "Amigos do Instituto Weizmann de São Paulo".

Projeto: Down's Syndrome: determination of serotonin receptor levels and resistance to glutamate (julho/1992)

2- Estágio no exterior durante curso de doutoramento

Department of Anesthesiology, University of Maryland, USA

Orientador: Prof. Dr. Gary Fiskum (agosto/98-fevereiro/99)

E) PRÊMIOS RECEBIDOS

1. Finalista do Prêmio Jovem Investigador - 1993

VIII Reunião Anual da Federação de Soc. de Biologia Experimental – FESBE

Caxambu (MG), Brasil

"A permeabilização da membrana mitocondrial interna por Ca^{2+} e prooxidantes é dependente de espécies reativas de oxigênio geradas na cadeia respiratória."

2. III Prêmio Adolfo Lutz - 1993

Melhor Trabalho da Área Básica

"A Permeabilização da Membrana Mitocondrial Interna por Ca^{2+} é Estimulada por *t*-Butil Hidroperóxido e mediada por Espécies Reativas de Oxigênio Geradas na Cadeia Respiratória".

II Congresso Médico Acadêmico da UNICAMP.

3. IV Prêmio Adolfo Lutz - 1994
Melhor Trabalho da Área Básica
"Coenzima Q como a Possível Fonte de Elétrons para a Produção de radicais de oxigênio durante o dano oxidativo de mitocôndrias estimulado por Ca^{2+} "
III Congresso Médico Acadêmico de UNICAMP.
4. Prêmio para Países em Desenvolvimento - 1996
36th American Society for Cell Biology Annual Meeting
5. Young Bioenergeticist Award – 1999
"Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition in GT1-7 hypothalamic tumor cells due to increased reducing power"
43rd Biophysical Society Meeting, Baltimore, MD, USA
6. Prêmio Jovem Talento em Ciências da Vida – 1999
Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular
Caxambu (MG), Brasil

F) CO-ORIENTAÇÃO DE ALUNOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Evandro S. Naia-da-Silva
Bolsa FAEP-UNICAMP 1997- 1998

Bruna M.A.R. Teixeira
Bolsa CNPq-IC 1997-1999

Jussiani Turin
Bolsa FAPESP 1999

G) TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

- 1- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1993) A permeabilização da membrana mitocondrial interna por Ca^{2+} e prooxidantes é dependente de espécies reativas de oxigênio geradas na cadeia respiratória. VIII Reunião Anual da Federação de Soc. de Biologia Experimental - FESBE Caxambu(MG), Brasil - agosto 25-28. *Livro de Resumos*, pg.272.
Trabalho selecionado para concorrer como finalista ao Prêmio Jovem Investigador/1993.
- 2- Castilho, R.F., Fagian, M.M., Kowaltowski, A.J., Meinicke, A.R., Mendes, M.F., Valle, V.G.R., Vercesi, A.E. (1993) Mitochondrial inner membrane permeabilization by Ca^{2+} is stimulated by prooxidants and mediated by oxygen radicals generated by mitochondria. IV International Symposium on Orthomolecular Medicine. Maksoud Plaza, São Paulo, Brasil, setembro 16-17. *Livro de Resumos*, pg. P.21.
- 3- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1994) Mitochondrial damage induced by Ca^{2+} ions: possible effect of mitochondrial generated reactive oxygen species and CoQ redox state.

XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, MG, Brasil, maio 14-17. *Livro de Resumos*, pg. 22.

- 4- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Meinicke, A.R., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E. (1994) Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} is stimulated by *t*-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. 85th Annual Meeting-ASBMB, Washington, D.C., May 21-25. *The FASEB Journal*, 8: A1298.
- 5- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1994) A permeabilização da membrana mitocondrial por Ca^{2+} e P_i é mediada por peroxidação lipídica promovida por espécies reativas de oxigênio produzidas pela mitocôndria. IX Reunião Anual da Federação de Soc. de Biologia Experimental - FESBE Caxambu (MG), Brasil - agosto 24-27. *Livro de Resumos*, pg. 309.
- 6- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E. (1995) Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations induced by Ca^{2+} ions. XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, MG, Brasil, maio 6-9. *Livro de Resumos*, pg. 24.
- 7- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1995) Mitochondrial membrane cyclosporin A-sensitive permeability transition is dependent on reactive oxygen species. X Reunião Anual da Federação de Soc. de Biologia Experimental - FESBE Serra Negra (SP), Brasil, agosto/1995. *Livro de Resumos*, pg. 363.
- 8- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E. (1996) The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, MG, Brasil, maio/1996. *Livro de Resumos*, pg. 5.
- 9- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E. (1996) The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. V International Symposium on Orthomolecular Medicine. São Paulo, Brasil, setembro 16-17. *Livro de Resumos*, pg. 144.
- 10- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1996) Mitochondrial oxidative stress and membrane permeability transition: conditions leading to irreversible inner membrane permeabilization in the presence of Ca^{2+} . Albany Conference on the Frontiers of Mitochondrial Research. Albany, NY, September 19-22. *Livro de Resumos*, Abstract 15.
- 11- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1996) Conditions leading to irreversible mitochondrial membrane permeabilization in the presence of Ca^{2+} . 36th American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, California, EUA, dezembro 7-11. *Livro de Resumos*, Abstract 2141. Resumo publicado em *Molecular Biology of the Cell* (1996) 7: 2141.
- 12- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E. (1997) 3,5,3' Triiodothyronine-induced mitochondrial permeability transition is mediated by reactive oxygen species and membrane protein thiol oxidation. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, MG, Brasil, maio/1997. *Livro de Resumos*, pg. 159.

- 13- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1997) Mitochondrial oxidative stress and membrane permeability transition. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, MG, Brasil, maio/1997. *Livro de Resumos*, pg. VIII.
- 14- Kowaltowski, A.J., Netto, L.E.S., Vercesi, A.E. (1998) The thiol-specific antioxidant prevents mitochondrial permeability transition: evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, MG, Brasil, maio/1998. *Livro de Resumos*, pg. 186.
- 15- Naia-da-Silva, E.S., Kowaltowski, A.J., Torriani, I., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1998) A detailed study of the effect of dibucaine on mitochondrial permeability transition. XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, MG, Brasil, maio/1998. *Livro de Resumos*, pg. 194.
- 16- B.M.A.R. Teixeira, Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1998) Mitochondrial permeability transition is inhibited by acidic pH due to the reduction of membrane protein thiol oxidation. XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, MG, Brasil, maio/1998. *Livro de Resumos*, pg. 194.
- 17- Kowaltowski, A.J., Costa, A.D.T., Vercesi, A.E. (1998) Activation of the plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. Tenth European Bioenergetics Conference, Göteborg, Suécia, Julho/98. Resumo publicado no *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 10, pg. 120.
- 18 - Kowaltowski, A.J., Netto, L.E.S., Vercesi, A.E. (1996) The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. 2nd Albany Conference on the Frontiers of Mitochondrial Research. Albany, NY, 24-27 Setembro. *Livro de Resumos*, Abstract 48.
- 19 - Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., Fiskum, G. (1998) Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition due to increased mitochondrial reducing power. NIH Inter-Institute Mitochondria Interest Group Minisymposium on Mitochondria: Genetics, Health and Disease. Bethesda, MD, 2 Dezembro. *Apoptosis and Mitochondria*, Poster 5.
- 20- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., Fiskum, G. (1999) Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition in GT1-7 hypothalamic tumor cells due to increased reducing power. 43rd Biophysical Society Annual Meeting, Baltimore, MD, 13-17 Fevereiro. Resumo publicado no *Biophysical Journal*, 76: A270.

H) PUBLICAÇÕES EM REVISTAS ESPECIALIZADAS:

- 1- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Meinicke, A.R., Vercesi, A.E. (1995) Oxidative damage of mitochondria induced by Fe(II)citrate or *t*-butyl hydroperoxide in the presence of Ca²⁺: effect of coenzyme Q redox state. *Free Radical Biology & Medicine* 18: 55-59.
- 2- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Meinicke, A.R., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E. (1995) Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions in the presence of *t*-butyl

hydroperoxide is mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine* 18: 479-486.

- 3- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1995) Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *American Journal of Physiology* 269: C141-C147.
- 4- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Meinicke, A.R., Almeida, A.M., Souza-Pinto, N., Fagian, M.M., Grijalba, M.T., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E. (1995) Mitochondrial oxidative damage promoted by a synergism between Ca^{2+} and prooxidants: inner membrane permeabilization and mtDNA breakage. *Ciência e Cultura* 47: 369-375 (revisão a convite).
- 5- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E. (1996) Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 2929-2934.
- 6- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1996) Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Letters* 378: 150-152.
- 7- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E. (1996) The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 28: 523-529.
- 8- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., Castilho, R.F. (1997) Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with *N*-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} : Correlation with mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1318: 395-402.
- 9- Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R., Castilho, R.F. (1997) The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Bioscience Reports* 17: 43-52 (revisão a convite).
- 10- Castilho, R.F., Vicente, J.A.F., Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E. (1997) 4,6-Dinitro-*o*-cresol uncouples oxidative phosphorylation and induces membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29: 1005-1011.
- 11- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F. (1997) Ca^{2+} acting at the external side of the inner mitochondrial membrane can stimulate mitochondrial permeability transition induced by phenylarsine oxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1322: 221-229.
- 12- Kowaltowski, A.J., Costa, A.D.T., Vercesi, A.E. (1998) Activation of the plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Letts.* 425: 213-216.
- 13- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E. (1998) 3,5,3' - Triiodothyronine-induced mitochondrial permeability transition is mediated by reactive oxygen species and membrane protein thiol oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 354: 151-157.

- 14- Kowaltowski, A.J., Netto, L.E.S., Vercesi, A.E. (1998) The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition: Evidence for the participation of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry* 273: 12766-12769.
- 15- Kowaltowski, A.J.*, Naia-da-Silva, E.S., Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1998) Ca^{2+} -stimulated mitochondrial reactive oxygen species generation and permeability transition are inhibited by dibucaine and Mg^{2+} . *Archives of Biochemistry and Biophysics* 359: 77-81.
- 16- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radicals in Biology and Medicine* 26: 436-471.
- 17- Teixeira, B.M.A.R., Kowaltowski, A.J.*, Castilho, R.F., Vercesi, A.E. (1999) Inhibition of mitochondrial permeability transition by low incubation medium pH is associated to less extensive membrane protein thiol oxidation. *Bioscience Reports* (em impressão).
- 18- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., Fiskum, G. (1999) Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release due to increased mitochondrial reducing power. *FASEB Journal* (submetido).
- 19- Kowaltowski, A.J., Smaili, S.S., Russell, J.P., Fiskum, G. (1999) Mitochondrial permeability transition decreases the resting mitochondrial membrane potential of intact cells, in a Bcl-2 sensitive manner. *American Journal of Physiology* (submetido).

* Autor correspondente

I) CAPÍTULOS DE LIVRO:

- 1- Vercesi, A.E., Jezek, P., Costa, A.D.T., Kowaltowski, A.J., Maia, I.G., Arruda, P. (1998) A Plant Uncoupling Mitochondrial Protein. Em: *Plant Mitochondria: From Gene to Function*, I.M. Møller, P. Gardeström, K. Glimelius e E. Glaser, eds. Backhuys Publishers, Leiden, Suécia.
- 2- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E. (1999) Reactive oxygen generation by mitochondria. Em: *Mitochondria in Pathogenesis*, J.J. Lemasters e A.-L. Nieminen, eds. Plenum Publishing Corporation (revisão a convite, em impressão).

J) ARTIGOS DE DIVULGAÇÃO (revistas de circulação nacional):

- 1- Vercesi, A.E., Meinicke, A.R., Kowaltowski, A.J. e Castilho, R.F. (1993) Lesões mitocondriais promovidas por estresse oxidativo: Papel de íons cálcio. *Revista Brasileira de Medicina Ortomolecular* 1: 103-112. (revisão a convite)
- 2- Castilho, R.F., Meinicke, A.R., Kowaltowski, A.J. e Vercesi, A.E. (1994) Lesões mitocondriais promovidas por peroxidação lipídica. *Revista Brasileira de Medicina Ortomolecular* 2: 105-113. (revisão a convite)

K) ATIVIDADES ARTÍSTICAS

Violinista atuante na orquestra *Oficina de Cordas*.

L) LÍNGUAS ESTRANGEIRAS

Inglês fluente.