

Mitocôndrias: Que Papel na Isquemia, Reperfusão e Morte Celular? [18]

PEDRO MONTEIRO, PAULO J. OLIVEIRA, LINO GONÇALVES, LUÍS A. PROVIDÊNCIA

Unidade de Investigação Básica em Cardiologia – Serviço de Cardiologia, Hospitais da Universidade de Coimbra, Coimbra
Clínica de Cardiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra
Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Coimbra

Rev Port Cardiol 2003;22 (2):233-254

RESUMO

A evolução do conhecimento das bases bioquímicas da isquemia miocárdica tem permitido definir em pormenor partes importantes da complexa cadeia de eventos intracelulares subjacente à cardiopatia isquémica, nas suas diversas manifestações.

Deste extraordinário esforço científico sobressai claramente a importância do papel desempenhado pelas mitocôndrias cardíacas em todo este processo. Associadas inicialmente apenas à produção de energia, as mitocôndrias têm vindo a revelar outras funções não menos importantes, tais como a promoção da homeostase do cálcio, o desenvolvimento de condicionamento isquémico e não isquémico e o controlo de mecanismos-chave na determinação da sobrevivência ou morte celular.

Este trabalho tem essencialmente dois objectivos. Em primeiro lugar, rever o conhecimento actual sobre a morfofisiologia das mitocôndrias e de que modo ela pode ser alterada por fenómenos de isquemia e isquemia-reperfusão. Em segundo lugar, este artigo pretende sumarizar o papel das mitocôndrias cardíacas na promoção da cardioprotecção e na modulação dos mecanismos de morte celular.

Palavras-Chave

Isquemia-reperfusão; Mitocôndrias; Cardioprotecção

ABSTRACT

Mitochondria: Role in Ischemia, Reperfusion and Cell Death

Recent advances in the knowledge of the biochemical basis of myocardial ischemia have enabled a better understanding of the complex sequence of events occurring in ischemic cardiomyopathy, whatever its manifestations. This has clearly highlighted the important role played by cardiac mitochondria in these events.

At first only associated with energy production, mitochondria have been clearly shown to have other important functions, like the maintenance of calcium homeostasis, as well as ischemic and non-ischemic preconditioning, and also modulation of cellular life and death.

The aims of this review are twofold: firstly, to review the current knowledge on mitochondrial morphology and structure, and how these can be affected by ischemia and ischemia-reperfusion; and secondly, to summarize the role of cardiac mitochondria in cardioprotection and modulation of cell death mechanisms.

Key words

Ischemia-reperfusion; Mitochondria; Cardioprotection

INTRODUÇÃO

A isquemia miocárdica caracteriza-se por um claro desequilíbrio entre a «oferta» e a «procura», isto é, entre o fornecimento e as necessidades das células miocárdicas em oxigénio (O₂) e nutrientes.

Este desequilíbrio pode ocorrer à custa de três situações. A primeira, ocorre perante um aumento das necessidades miocárdicas de O₂ e nutrientes (isquemia de consumo). Vários factores poderão contribuir para este quadro, pois em caso de obstrução coronária pré-existente, a necessidade de um maior fornecimento de O₂ e nutrientes, condicionada pelo exercício físico, taquicardia ou emoções, provoca um desequilíbrio transitório. Esta é a causa da maioria dos episódios de angina estável crónica. A segunda situação consiste numa diminuição do aporte de O₂ e nutrientes (isquemia de aporte), devida a um maior tónus vascular coronário ou a agregados ou trombos coronários, os quais estão habitualmente na base dos episódios de angina instável e de enfarte agudo do miocárdio. Finalmente, pode também ocorrer uma situação mista, em que estão simultaneamente presentes os dois factores anteriormente referidos⁽¹⁾.

Quando uma situação de desequilíbrio aporte/consumo se concretiza (independentemente do mecanismo que lhe está subjacente), dela decorrem consequências bioquímicas, mecânicas, eléctricas, cuja intensidade está largamente (embora não totalmente) relacionada com a magnitude da isquemia miocárdica, podendo, inclusivamente, culminar na morte celular.

Este trabalho de revisão tem como objectivo apresentar o estado actual dos conhecimentos sobre o papel das mitocôndrias cardíacas no contexto da isquemia e isquemia-reperusão (IR) miocárdicas, bem como o seu papel na modulação da vida e morte dos cardiomiócitos.

Fisiopatologia da isquemia miocárdica

A cada momento os cardiomiócitos consomem a quase totalidade da energia que produzem, pelo que as suas reservas energéticas são muito reduzidas (permitem apenas assegurar a contracção cardíaca durante alguns segundos)⁽²⁾. Além disso, o coração possui reservas muito escassas de O₂ pelo que, após uma oclusão coronária, a taxa relativamente elevada de consumo energético dos miócitos determina uma diminuição rápida e substancial da tensão de O₂ e da contractilidade miocárdica.

INTRODUCTION

Myocardial ischemia is characterized by a marked imbalance between supply and demand, that is between the provision of oxygen (O₂) and nutrients to myocardial cells and their needs.

This imbalance may arise for any of three reasons. The first results from an increase in the myocardium's need for O₂ and nutrients (demand ischemia). Various factors can contribute to this situation. Firstly, in the case of pre-existing coronary artery obstruction, the need for a greater supply of O₂ and nutrients arising from physical exercise, tachycardia or emotional stress can cause a temporary imbalance. This is the cause of most episodes of chronic stable angina. The second type consists in a decrease in the supply of O₂ and nutrients (supply ischemia) due to greater coronary vascular tone or to coronary aggregates or thrombi, which are usually the cause of unstable angina and acute myocardial infarction. Finally, the imbalance may result from a mixed situation in which the above two factors are simultaneously present⁽¹⁾.

When such an imbalance of supply and demand occurs, whatever its underlying mechanism, it has biochemical, mechanical and electrical repercussions, the intensity of which is largely (although not completely) dependent on the magnitude of myocardial ischemia, and which can even result in cell death.

This review aims to present the current state of knowledge of the role of cardiac mitochondria in myocardial ischemia and ischemia-reperfusion (IR), as well as their role in modulating cardiomyocyte life and death.

Pathophysiology of myocardial ischemia

At any given moment, cardiomyocytes consume almost all the energy they produce, which means that their energy reserves are very small, only sufficient to maintain cardiac contraction for a few seconds⁽²⁾. Furthermore, the heart has very small O₂ reserves, so that after coronary occlusion the relatively high rate of myocyte oxygen consumption leads to a rapid and substantial fall in O₂ tension and myocardial contractility.

Under these circumstances, the ability of heart muscle to survive will be greatly reduced unless it is able to adapt rapidly to the new conditions⁽¹⁾. One of the specific characteristics of cardiomyocyte metabolism is their ability to

Em face desta realidade, a capacidade de sobrevivência do músculo cardíaco seria muito reduzida se ele não fosse capaz de se adaptar a novas condições de forma bastante rápida⁽¹⁾. Uma das características particulares do metabolismo dos cardiomiócitos é a sua capacidade de produzir energia a partir de ácidos gordos, num processo conhecido como β -oxidação. Não obstante, as células cardíacas são também capazes de produzir energia a partir de outros substratos energéticos, como sejam a glicose, o piruvato e o lactato. Isto permite ao miocárdio passar de um metabolismo energético quase totalmente baseado nos ácidos gordos (após uma grande ingestão de alimentos ricos em lípidos), para um metabolismo mais balanceado (por exemplo, em caso de diabetes, exercício físico intenso ou escassez de nutrientes). O consumo de O_2 associado a estas alternativas metabólicas é muito diferente (a oxidação de glicose consome menos O_2 do que a β -oxidação de ácidos gordos)^(3, 4). O excesso de oxidação de ácidos gordos está intimamente associado à disfunção cardíaca, pois caracteriza-se por um excessivo consumo de O_2 para produzir um mesmo nível de trabalho cardíaco. Durante a isquemia, a oxidação de substratos lipídicos é subitamente bloqueada; em contraste, ela aumenta marcadamente durante a reperfusão, levando à acumulação de diversos metabolitos potencialmente tóxicos, tais como acil-carnitinas, lisofosfolípidos e acil-coenzima A⁽⁵⁾.

Para além da capacidade de adaptação metabólica, o miocárdio é ainda capaz de modular a sua actividade contráctil, permitindo que ela se reduza de forma transitória em períodos de aporte nutricional deficiente (miocárdio «hibernante») ou em momentos de grande *stress* oxidativo (miocárdio «atordoado»).

O conceito de miocárdio «hibernante» foi introduzido por Rahimtoola⁽⁶⁾, para descrever o estado de redução da função ventricular em repouso no contexto de doença coronária. Este fenómeno ocorre em cerca de um terço dos doentes com insuficiência coronária crónica⁽⁷⁾, funcionando como mecanismo protector do miocárdio sujeito a hipoperfusão crónica, pelo qual se evitam fenómenos de necrose em troca de uma redução reversível da actividade contráctil dos cardiomiócitos. A hibernação, total ou parcialmente reversível após terapêutica de revascularização, foi elucidativamente caracterizada por Hearse⁽⁸⁾ como «uma extraordinária forma de adaptação da actividade tecidual às circunstâncias do meio». Já o «atordoamento»

produce energy from fatty acids, in a process known as β -oxidation. However, cardiac cells are also able to produce energy using other energy substrates, such as glucose, pyruvate and lactate. This enables the myocardium to change from an energy metabolism based almost entirely on fatty acids (after a large meal rich in lipids) to a more balanced metabolism (for example, with diabetes, strenuous physical exercise or shortage of nutrients). O_2 consumption associated with these alternative types of metabolism is very different, the oxidation of glucose using less O_2 than the β -oxidation of fatty acids^(3, 4). Excessive oxidation of fatty acids is closely linked to cardiac dysfunction, as it requires greater O_2 consumption for the same level of cardiac work. During ischemia, the oxidation of lipid substrates is suddenly blocked; by contrast, it increases markedly during reperfusion, leading to the accumulation of various potentially toxic metabolites, such as acylcarnitines, lysophospholipids and acyl-coenzyme A⁽⁵⁾.

Besides its capacity for metabolic adaptation, the myocardium is also able to modulate its contractile activity, reducing it temporarily in periods of inadequate supply of nutrients (“hibernating” myocardium) or at times of severe oxidative stress (“stunned” myocardium).

The term “hibernating myocardium” was coined by Rahimtoola⁽⁶⁾ to describe the state of reduced ventricular function at rest in the context of coronary artery disease. This phenomenon occurs in around a third of patients with chronic heart failure⁽⁷⁾, and functions as a protective mechanism for myocardium undergoing chronic hypoperfusion, preventing necrosis by means of a reversible decrease in cardiomyocyte contractile activity. Hibernation, completely or partially reversible after revascularization, was well described by Hearse⁽⁸⁾ as “an extraordinary form of adaptation of tissue activity to environmental circumstances”. Myocardial stunning is characterized by reduced myocardial contractility in the presence of normal perfusion levels, and often occurs after severe ischemic insults such as episodes of unstable angina⁽⁹⁾ and acute myocardial infarction. This phenomenon, probably associated with the production of reactive oxygen species (ROS) and changes in calcium (Ca^{2+}) homeostasis⁽¹⁰⁾, is usually at least partially reversible, and the degree of recovery of ventricular function has important prognostic implications⁽¹¹⁾.

miocárdico caracteriza-se por uma redução da contractilidade miocárdica na presença de níveis normais de perfusão, ocorrendo frequentemente após insultos isquémicos graves, como episódios de angina instável⁽⁹⁾ e enfarte agudo do miocárdio; este fenómeno, provavelmente associado com a produção de radicais livres de oxigénio (ROS) e alterações da homeostase do cálcio (Ca²⁺)⁽¹⁰⁾, é habitualmente reversível (pelo menos parcialmente), sendo que o grau de recuperação da função ventricular tem importantes implicações prognósticas⁽¹¹⁾.

A série de fenómenos bioquímicos pelos quais a isquemia do miocárdio pode conduzir a depressão funcional da contractilidade miocárdica não está ainda completamente esclarecida.

Em relação ao «miocárdio hibernante» estudos recentes têm levantado a hipótese da importância da apoptose, eventualmente mediada por citocinas, proteínas de choque térmico, *stress* oxidativo e/ou óxido nítrico⁽⁷⁾, embora para já existam mais dúvidas do que certezas⁽¹²⁾.

Foram também propostos diversos mecanismos para explicar o «atordoamento» miocárdico, incluindo a produção insuficiente de energia pelas mitocôndrias⁽¹³⁾, a redução do uso de energia pelas miofibrilas⁽¹³⁾, a menor reactividade dos neurónios simpáticos⁽¹³⁾, lesões da matriz de colagénio extracelular, menor sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, desacoplamento excitação-contracção por disfunção do retículo sarcoplasmático⁽¹⁴⁾, sobrecarga intracelular de cálcio^(15, 16) e maior geração de ROS⁽¹⁷⁻²⁰⁾. Mecanismos pouco prováveis são a insuficiente produção de energia (apesar de esta ser um facto⁽⁷⁾), o seu menor uso pelas miofibrilas e a perfusão deficiente do miocárdio⁽¹³⁾, porque a contractilidade do miocárdio «deprimido» pode restaurar-se de forma rápida, embora transitória, pela estimulação inotrópica⁽²¹⁻²³⁾. Entre os mecanismos mais prováveis encontram-se a sobrecarga transitória de Ca²⁺ nos miócitos (imediatamente após a reperfusão)^(15, 16), o desacoplamento da excitação-contracção pela disfunção isquémica do retículo sarcoplasmático⁽¹⁴⁾ e a geração de ROS⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

Enumeradas as principais alterações subjacentes à isquemia (e reperfusão), importa conhecer melhor as bases ultraestruturais e metabólicas das mitocôndrias e de que forma podem elas influenciar e serem influenciadas pela isquemia e IR.

Mitocôndrias: ultraestrutura e fisiologia

Ao longo do processo evolutivo da vida no nosso planeta, as mitocôndrias desenvolveram

The series of biochemical phenomena by which myocardial ischemia can lead to functional depression of myocardial contractility is not fully understood.

With regard to hibernating myocardium, recent studies have suggested the important role of apoptosis, possibly mediated by cytokines, heat shock proteins, oxidative stress and/or nitric oxide⁽⁷⁾, although there are as yet more questions than answers⁽¹²⁾.

Various mechanisms have also been proposed to explain myocardial stunning, including insufficient energy production by mitochondria⁽¹³⁾, reduction in energy use by myofibrils⁽¹³⁾, lowered reactivity of sympathetic neurons⁽¹³⁾, damage to the extracellular collagen matrix, reduced sensitivity of myofilaments to calcium^(15, 16), excitation-contraction decoupling due to dysfunction of the sarcoplasmic reticulum⁽¹⁴⁾, intracellular calcium overload^(15, 16) and greater generation of ROS⁽¹⁷⁻²⁰⁾. The less likely mechanisms include insufficient energy production (although this indeed occurs⁽⁷⁾), reduced energy use by myofibrils, and inadequate perfusion of the myocardium⁽¹³⁾, since the contractility of “depressed” myocardium can be rapidly (but only temporarily), restored by inotropic stimulation⁽²¹⁻²³⁾. Among the more likely mechanisms are transient Ca²⁺ overload in myocytes immediately after reperfusion^(15, 16), excitation-contraction decoupling through ischemic dysfunction of the sarcoplasmic reticulum⁽¹⁴⁾ and the generation of ROS⁽¹⁷⁻²⁰⁾.

Having described the main alterations underlying ischemia (and reperfusion), we should now consider in more detail the ultrastructure and metabolism of mitochondria and how they influence and are influenced by ischemia and IR.

Mitochondria: ultrastructure and physiology

Over the course of evolution of life on this planet, mitochondria have developed a strategy of producing adenosine triphosphate (ATP) based on the transfer of electrons from reducing compounds such as reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) to O₂. At the same time, they eject protons (H⁺), generating an electrical potential across the inner mitochondrial membrane. They have also created a system of lipid oxidation by transporting long-chain fatty acids, as well as a method of regulating their function according to the energy needs of the cell that is dependent on the concentration of intramitochondrial Ca²⁺ (Ca²⁺ act-

uma estratégia para a produção de adenosina trifosfato (ATP), baseada na transferência de electrões desde compostos redutores (como a nicotinamida adenina dinucleótido reduzida – NADH) até ao O₂. Ao mesmo tempo, ejectam protões (H⁺) para o exterior, gerando um potencial eléctrico através da membrana mitocondrial interna. Criaram também um sistema de oxidação de lípidos, por meio de um transporte específico de ácidos gordos de cadeia longa; possuem igualmente um sistema que regula o seu funcionamento em função das necessidades energéticas da célula, o qual está dependente da concentração de Ca²⁺ intramitocondrial (o Ca²⁺ activa várias enzimas-chave nas mitocôndrias). O metabolismo mitocondrial produz ROS, sendo que a quantidade de ROS que «escapam» das mitocôndrias poderá controlar a duração da vida de cada célula. Transitoriamente, podem formar-se nas mitocôndrias poros proteicos, por onde se liberta parte do conteúdo mitocondrial, incluindo citocromo c, o qual desencadeia uma série de eventos conducentes à morte celular («programada» – apoptose – ou não programada – necrose); este poro gigante é modulado por diversas substâncias (incluindo proteínas da família Bcl-2), as quais, por este meio, podem controlar a morte celular^(24, 25).

Para controlar todas estas funcionalidades, as mitocôndrias possuem um genoma reduzido que codifica algumas das proteínas essenciais ao seu funcionamento; cada mitocôndria tem várias cópias de ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADN_{mt}) e cada cópia é constituída por uma só hélice de 16 569 nucleótidos, os quais codificam 13 proteínas (das quais 7 pertencem ao complexo I)⁽²⁶⁾. O ADN_{mt} é muito susceptível a lesões oxidativas, dado não possuir histonas, ter mecanismos de reparação pouco eficientes e estar espacialmente próximo da cadeia respiratória, local de produção dos ROS. A oxidação do ADN_{mt} por ROS pode resultar em mutações (até porque o ADN_{mt} não possui intrões, logo todo ele codifica proteínas essenciais) que levarão a inibição da fosforilação oxidativa, aumento do *leak* de electrões (logo, dos ROS) e redução da produção de ATP^(27, 28). O ADN_{mt} sofre um número de mutações 10 vezes superior ao que ocorre no genoma nuclear (este valor aumenta com o envelhecimento e em todas as situações de *stress* metabólico). Sabe-se, por exemplo, que diversas doenças (incluindo certas miopatias e cardiomiopatias) são devidas a mutações mitocon-

ivates various key enzymes in mitochondria). The mitochondrial metabolism produces ROS, and the amount of ROS that “escapes” from the mitochondria can control the lifespan of each cell. Protein pores can form temporarily in the mitochondrial membrane, through which part of the contents of the mitochondrion is released, including cytochrome c, which triggers a series of events that leads to cell death (programmed – apoptosis – or unprogrammed – necrosis). These large pores are modulated by various substances, including proteins of the Bcl-2 family, which in this way are able to control cell death^(24, 25).

To control all these functions, mitochondria have a small genome that codes for some of the proteins that are essential to their functioning. Each mitochondrion has several copies of mitochondrial deoxyribonucleic acid (mtDNA), each copy consisting of a single helix of 16 569 nucleotides that codes for 13 proteins, seven of which belong to complex I⁽²⁶⁾. As it lacks histones, has inefficient repair mechanisms, and is very close to the respiratory chain, where ROS are produced, mtDNA is highly susceptible to oxidative damage. Oxidation of mtDNA by ROS may result in mutations (since mtDNA has no introns, all its genes code for essential proteins) that can lead to the inhibition of oxidative phosphorylation, increase in electron leakage (and therefore increased production of ROS), and decrease in ATP production^(27, 28). The rate of mutations in mtDNA is 10 times higher than in nuclear DNA, and this rate increases with aging and in all situations of metabolic stress. It is known, for example, that several diseases (including some forms of myopathy and heart disease) are caused by mitochondrial mutations and/or mitochondrial damage resulting from cellular calcium ion overload.

Within the mitochondrion, the carboxyl groups of organic acids are metabolized to carbon dioxide (CO₂), while hydrogen atoms are transferred to specialized molecules, oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and oxidized flavin adenine dinucleotide (FAD), producing NADH and reduced flavin adenine dinucleotide (FADH₂). When NADH is oxidized to NAD⁺ by complex I in the mitochondrion, protons are pumped out of the mitochondrion, creating a membrane electrical potential. In turn, the electrons are transferred in a series of steps to O₂, producing molecules of water (*Fig. 1*). The relation between the production

driais e/ou a lesões mitocondriais favorecidas pela sobrecarga celular de iões cálcio.

No interior das mitocôndrias, os grupos carboxilo dos ácidos orgânicos são metabolizados sob a forma de dióxido de carbono (CO₂), enquanto que os átomos de hidrogénio são transferidos para moléculas especializadas, a nicotinamida adenina dinucleótido oxidada (NAD⁺) e a flavinamida adenina dinucleótido oxidada (FAD), dando origem ao NADH e à flavinamida adenina dinucleótido reduzida (FADH₂). Quando o NADH é oxidado a NAD⁺ pelo complexo I da mitocôndria, os prótons são bombeados para o exterior da mitocôndria, criando um potencial eléctrico membranar. Por sua vez, os electrões são transferidos numa série de etapas até ao O₂, com produção de moléculas de água (Fig. 1). A relação entre a produção de água (composto inerte) e a de radical superóxido (O₂⁻ composto bastante reactivo) varia consoante o tecido e a idade (29, 30).

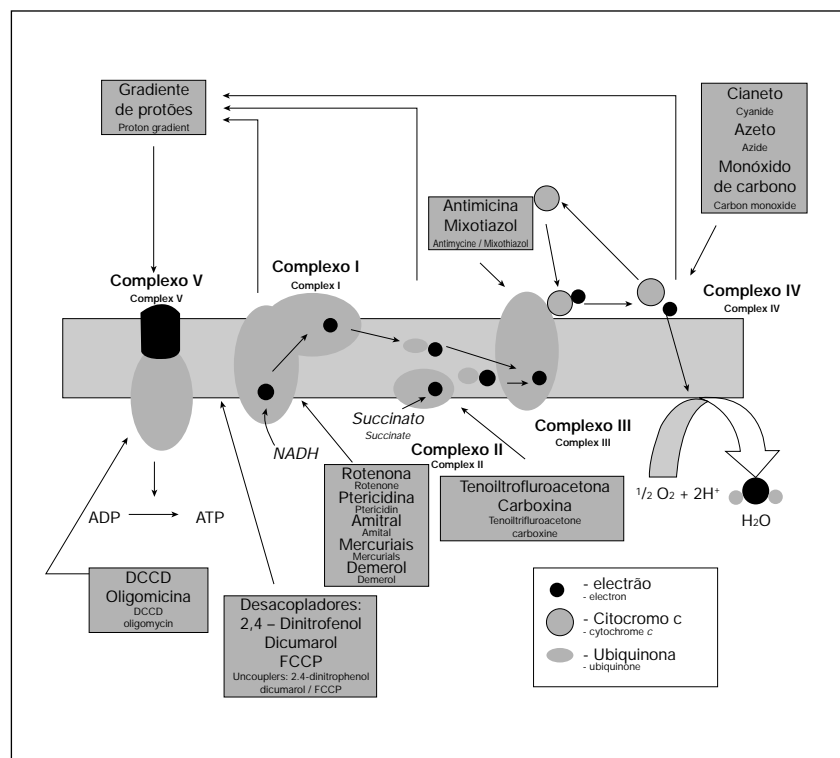
A transferência de electrões até ao O₂ só é possível porque a membrana mitocondrial interna possui uma série de complexos proteicos, organizados em cinco complexos (26). O complexo I (NADH: Coenzima Q reductase) é composto por 41 polipéptidos diferentes, sendo capaz de oxidar o NADH. Bombeia prótons para o exterior da mitocôndria, contribuindo para o gradiente electroquímico de prótons e pode

of water (an inert compound) and of the superoxide radical (O₂⁻), a highly reactive compound, varies according to tissue and age (29, 30).

The electron transfer to O₂ is only possible because the inner mitochondrial membrane contains a series of five protein complexes (26). Complex I (NADH: coenzyme Q reductase) is made up of 41 different polypeptides and can oxidize NADH. It pumps protons out of the mitochondrion, contributing to the proton electrochemical gradient, and can lead to ROS generation. This complex is inhibited by the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺), by rotenone and by nitric oxide. Complex II (succinate: ubiquinone reductase), which is composed of four proteins, catalyzes the oxidation of succinate to fumarate, with the formation of ubiquinol from ubiquinone; the supply of succinate (via the Krebs cycle) enables a 'short-circuit' to be established, bypassing complex I. Complex II is inhibited by 3-nitropropionic acid, malonate and nitric oxide. Complex III (ubiquinol: cytochrome c reductase) results from the association of 11 different proteins. This complex uses ubiquinone to expel a proton from the mitochondrion and to simultaneously transfer an electron to cytochrome c. This complex appears to be involved in the formation of ROS. Complex IV (cytochrome c oxidase) reduces O₂ to water and uses the re-

Fig. 1 Representação esquemática da cadeia respiratória, com os seus componentes, substratos e inibidores.

Fig. 1 Diagram of the respiratory chain, with its components, substrates and inhibitors.



conduzir à geração de ROS; este complexo é inibido pela neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺), pela rotenona e pelo óxido nítrico. O complexo II (Succinato: Ubiquinona reductase) é constituído por quatro proteínas; cataliza a oxidação do succinato em fumarato, com a formação de ubiquinol a partir da ubiquinona; o aporte do succinato (a partir do ciclo de Krebs), permite fazer um «curto-circuito» relativamente ao complexo I; o complexo II é inibido pelo ácido 3-nitropropiónico, malonato e óxido nítrico. Quanto ao complexo III (Ubiquinol: Citocromo *c* reductase), ele é constituído por 11 proteínas. Através do ubiquinol, e ao mesmo tempo que ocorre a expulsão de um protão para fora da mitocôndria, um electrão é transferido para o citocromo *c*. Este complexo parece estar envolvido na formação de ROS. O complexo IV (Citocromo *c* oxidase) reduz o O₂ a água e utiliza a energia produzida para bombear protões para o exterior da mitocôndria. Este complexo é inibido por cianeto, azeto e monóxido de carbono. No complexo V (F₀F₁-ATPase ou ATP sintase) o gradiente de protões estabelecido pelos complexos I, III e IV é utilizado para a síntese de ATP. Através deste complexo, os protões fluem para a matriz mitocondrial, graças à combinação de dois gradientes: o de concentração de protões (diferença de pH – superior no espaço intermembranar mitocondrial em relação ao exterior) e o do potencial eléctrico membranar (negativo no interior da mitocôndria). Este complexo é inibido pela oligomicina.

Em condições de aerobiose, a oxidação dos hidratos de carbono está acoplada ao bombeamento de protões da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, enquanto que, durante a geração de ATP, os protões fluem de novo através da membrana mitocondrial, atravessando as subunidades F₀ e F₁ do complexo V em direcção à matriz. Neste processo, denominado fosforilação oxidativa, o movimento de electrões através da membrana está acoplado à geração de uma força protomotriz, fazendo com que o processo de transporte de electrões, bombeamento de protões e geração de ATP se tornem interdependentes. A geração deste gradiente electroquímico de protões e a sua subsequente utilização para a síntese de ATP ocorrem normalmente em simultâneo e estão intimamente relacionados (*Fig. 1*).

Por cada molécula de NADH ou succinato oxidada, dois electrões são transportados e reduzem um átomo de oxigénio. A eficiência da

sulting energy to pump protons out of the mitochondrion. This complex is inhibited by cyanide, azide and carbon monoxide. In complex V (F₀F₁-ATPase or ATP synthase), the proton gradient established by complexes I, III and IV is used to synthesize ATP. Via this complex, protons flow to the mitochondrial matrix, due to the combination of two gradients: that of proton concentration (higher pH in the mitochondrial intermembrane space than outside) and of membrane electrical potential (negative inside the mitochondrion). This complex is inhibited by oligomycin.

In aerobic conditions, oxidation of carbohydrates is coupled to the pumping of protons from the mitochondrial matrix into the intermembrane space, while during ATP generation protons flow across the mitochondrial membrane once more, crossing the F₀ and F₁ subunits of complex V towards the matrix. In this process, called oxidative phosphorylation, the movement of electrons across the membrane is linked to the generation of a protomotive force, so that the processes of electron transport, proton pumping and ATP synthesis become interdependent. The generation of this electrochemical gradient and its subsequent use to synthesize ATP normally occur simultaneously and are closely linked (*Fig. 1*).

For every molecule of NADH or succinate oxidized, two electrons are transported and reduce an oxygen atom. The efficiency of oxidative phosphorylation can be expressed by the adenosine diphosphate/oxygen ratio (ADP/O), being the number of ATP molecules produced per atom of oxygen consumed. If isolated intact mitochondria have an available energy substrate (succinate, glutamate/malate), O₂ and inorganic phosphate (Pi), but limiting adenosine diphosphate (ADP), the oxidation of the substrate and the reduction of O₂ decrease rapidly as ADP is converted to ATP.

Mitochondria and ischemia

Mitochondria are known as the powerhouses of the cell. This is particularly true in the case of cardiomyocytes, in which mitochondria make up around 40 % of cell volume. Besides ATP synthesis, cardiac mitochondria perform another essential activity: maintenance of cytosolic Ca²⁺ homeostasis⁽³¹⁾. They perform these two functions using the same energy source, the electrochemical H⁺ gradient.

During myocardial ischemia there are alterations in intracellular Ca²⁺ homeostasis; in

fosforilação oxidativa pode ser expressa pelo rácio adenosina difosfato/oxigénio (ADP/O), ou seja, o número de moléculas de ATP produzidas por átomo de oxigénio consumido. Se mitocôndrias intactas isoladas dispuserem de substratos energéticos (succinato, glutamato/malato), O_2 e fosfato inorgânico (Pi), mas adenosina difosfato (ADP) limitante, a oxidação dos substratos e a redução do O_2 diminuem rapidamente, à medida que o ADP for convertido em ATP.

Mitocôndrias e isquemia

As mitocôndrias são conhecidas como as «centrais energéticas» celulares. Isto é particularmente verdade no que diz respeito aos cardiomiócitos, onde as mitocôndrias representam cerca de 40 % do volume celular. Para além da síntese de ATP, as mitocôndrias cardíacas participam igualmente noutra actividade essencial: a manutenção da homeostase do Ca^{2+} citosólico⁽³¹⁾. Estas duas actividades são executadas graças à mesma fonte de energia: o gradiente electroquímico de H^+ .

Durante a isquemia miocárdica ocorre uma alteração da homeostase do Ca^{2+} intracelular, o que leva a que as mitocôndrias tentem tampenizar o Ca^{2+} citosólico, o que resulta em limitações na capacidade de síntese de ATP⁽³²⁾. Por esta razão, diminuem gradualmente as reservas tecidulares de fosfatos de alta energia. Os depósitos de creatina fosfato diminuem mais rapidamente do que os de ATP, sendo que a creatina fosfato acaba por se esgotar por transferência de fosfatos de alta energia para o ADP, à medida que diminui a síntese oxidativa de ATP. Como não ocorre a fosforilação oxidativa normal, o ADP converte-se em adenosina monofosfato (AMP) (numa reacção catalizada pela miocinase), o qual, por sua vez, é convertido em adenosina e finalmente inosina, hipoxantina e xantina⁽³³⁾. Estas modificações metabólicas são mais notáveis ao nível do subendocárdio. A diminuição das reservas de ATP interfere com as trocas de sódio (Na^+) e potássio (K^+) ao nível do sarcolema, fazendo com que aumente o sódio intracelular, o qual é depois trocado pelo Ca^{2+} , com aumento do Ca^{2+} intracelular. A lesão do miocárdio induzida por isquemia conduz à formação de complexos de Ca^{2+} , detectáveis por microscopia electrónica⁽³¹⁾. A diminuição das reservas de ATP também reduz a captação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e diminui a saída de Ca^{2+} dos cardiomiócitos através de cálcio-adenosina trifosfatases

this setting, mitochondria will attempt to sequester cytosolic Ca^{2+} , which decreases their capacity to synthesize ATP⁽³²⁾. Consequently there is a gradual reduction in tissue reserves of high-energy phosphates. Reserves of creatine phosphate are depleted more rapidly than those of ATP, since they are used up by transfer of high-energy phosphate to ADP as oxidative synthesis of ATP decreases. As normal oxidative phosphorylation does not take place, ADP is converted to adenosine monophosphate (AMP) in a reaction catalyzed by myokinase, and this is in turn converted to adenosine and finally to inosine, hypoxanthine and xanthine⁽³³⁾. These metabolic changes are more marked in the subendocardium. Reduction in ATP reserves affects sodium (Na^+) and potassium (K^+) exchange in the sarcolemma, leading to an increase in intracellular sodium, which is then replaced by Ca^{2+} , with a rise in intracellular Ca^{2+} . Myocardial damage caused by ischemia leads to the formation of Ca^{2+} complexes that can be detected by electron microscopy⁽³¹⁾. Lower ATP reserves also reduce Ca^{2+} uptake by the sarcoplasmic reticulum and reduce Ca^{2+} egress from cardiomyocytes in the form of calcium-adenosine triphosphatases (Ca^{2+} -ATPases). The increase in intracellular Ca^{2+} concentrations leads to increased intramitochondrial calcium levels, which further reduces ATP production⁽¹⁾. In isolated mitochondria with similar matrix Ca^{2+} concentrations to those found in ischemia, there is «futile» O_2 consumption, as the mitochondrion attempts to retain Ca^{2+} . It can thus be stated that the mechanism through which Ca^{2+} affects ATP synthesis depends on the uncoupling of phosphorylation and mitochondrial respiratory chain activity (oxidation)⁽³⁴⁻³⁶⁾.

When damage to cardiac tissue caused by ischemia is reversible and the myocardium retains its viability after coronary perfusion is re-established, ATP reserves may still exceed 60 % of normal. For instance, electron microscopy may show only glycogen depletion, or accumulation of nuclear chromatin, interfibrillar swelling or edema or mitochondrial swelling, with no accumulation of dense amorphous bodies in the mitochondria or damage to the sarcolemma⁽¹⁾. However, if the quantity of ATP falls below 20 % of its normal value, the cells are unable to regenerate high-energy phosphates or to maintain physiological ion gradients and cell volume. The activation of intracellular Ca^{2+} -ATPases accelerates ATP consumption and activates phospholipases in the sarco-

(Ca²⁺-ATPases). O aumento da concentração intracelular de Ca²⁺, ocasiona o aumento da sua concentração intramitocondrial, o que contribui para uma redução ainda maior da produção de ATP⁽¹⁾. Em mitocôndrias isoladas com concentrações matriciais de Ca²⁺ semelhantes às que ocorrem na isquemia, existe um consumo «fútil» de O₂, de modo a tentar reter o Ca²⁺ no interior da mitocôndria. Pode, pois, afirmar-se que o mecanismo pelo qual o Ca²⁺ afecta a síntese de ATP depende do desacoplamento entre a fosforilação e a actividade da cadeia respiratória mitocondrial (oxidação)⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Quando o tecido cardíaco sofre apenas uma lesão reversível causada pela isquemia, mantendo a sua viabilidade após restabelecimento da perfusão coronária, as reservas de ATP podem, ainda assim, ultrapassar os 60 % do normal. Por exemplo, em microscopia electrónica, pode demonstrar-se apenas uma depleção de glicogénio, acumulações de cromatina nuclear, turgescência ou edema interfibrillar e turgescência das mitocôndrias, sem que ocorra acumulação de corpos densos amorfos nas mitocôndrias nem lesões do sarcolema⁽¹⁾. Quando o conteúdo de ATP diminui para menos de 20 % do valor normal, as células deixam de ser capazes de regenerar os fosfatos de alta energia e de preservar os gradientes iónicos fisiológicos e o volume celular. A activação das Ca²⁺-ATPases intracelulares intensifica o consumo de ATP e activa as fosfolipases do sarcolema, as quais libertam produtos de degradação dos fosfolípidos da membrana, cujas propriedades detergentes lesam a integridade membranar⁽³⁷⁾.

A redução das reservas de fosfatos de alta energia, a turgescência celular e as lesões do sarcolema (possivelmente por lipoperoxidação) são decisivas na morte celular por isquemia^(31, 34, 38).

Mitocôndrias e reperfusão

Em condições normais, o consumo de O₂ pelas mitocôndrias é bastante eficiente, uma vez que cerca de 90 % sofre redução tetravalente ao nível do complexo IV e só cerca de 2-4 % sofre redução univalente (sobretudo a partir da forma reduzida da coenzima Q), com formação de ROS (como o O₂⁻ e o peróxido de hidrogénio – H₂O₂)⁽³⁹⁾. A mitocôndria possui um sistema antioxidante, habitualmente capaz de neutralizar eficientemente estes compostos; este sistema é fundamentalmente constituído pela superóxido dismutase (SOD) e pela glutathione peroxidase (GPX)^(39, 40). A SOD converte o

lemma; these release breakdown products from the membrane phospholipids whose detergent properties compromise membrane integrity⁽³⁷⁾.

Reductions in high-energy phosphate reserves, cell swelling and damage to the sarcolemma (possibly by lipoperoxidation) are decisive in ischemic cell death^(31, 34, 38).

Mitochondria and reperfusion

Under normal conditions, O₂ consumption by mitochondria is highly efficient, since around 90 % undergoes tetravalent reduction by complex IV and only 2-4 % undergoes univalent reduction (mainly by the reduced form of coenzyme Q), with the formation of ROS such as O₂⁻ and hydrogen peroxide, H₂O₂⁽³⁹⁾. The mitochondrion, has an antioxidant system that is usually able to neutralize these compounds effectively; this system consists basically of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX)^(39, 40). SOD converts O₂⁻ to H₂O₂ and GPX reduces H₂O₂ to water (H₂O), using as substrate reduced glutathione (GSH), which is converted to oxidized glutathione (GSSG). When O₂ is reintroduced with reperfusion, production of O₂⁻ increases, not only outside the mitochondrion, but also in the mitochondrial electron transport chain⁽⁴¹⁾ (*Fig. 2*). It has been shown that the quantity of O₂⁻ produced under these circumstances depends on the duration of ischemia and reperfusion⁽⁴²⁾; at the same time, the severity and duration of cellular hypoxia are important in the regulation of levels of antioxidant enzymes and other ROS scavengers, and ultimately determine the extent of reperfusion injury^(43, 44). In experimental models of IR, it has been possible to reduce mitochondrial ROS production by using respiratory chain inhibitors⁽⁴⁵⁾, but not with allopurinol an inhibitor of xanthine oxidase, an important source of ROS originating from outside the mitochondria⁽⁴⁶⁾. The respiratory chain of mitochondria that have undergone hypoxia and reoxygenation is less efficient due to oxidative damage, not only in proteins of the respiratory chain, but also through lipoperoxidation of the lipid membrane, confirmed by elevated levels of malonyldialdehyde, a marker of this phenomenon⁽⁴⁷⁾. The harm done by these processes can be even greater when, during reperfusion, antioxidant defenses (SOD, GPX and GSH) are weakened⁽⁴⁸⁾. SOD deficiency can result in dangerously high levels of peroxynitrite (resulting from the reaction between O₂⁻ and nitric oxide, NO), and low levels of GSH are associat-

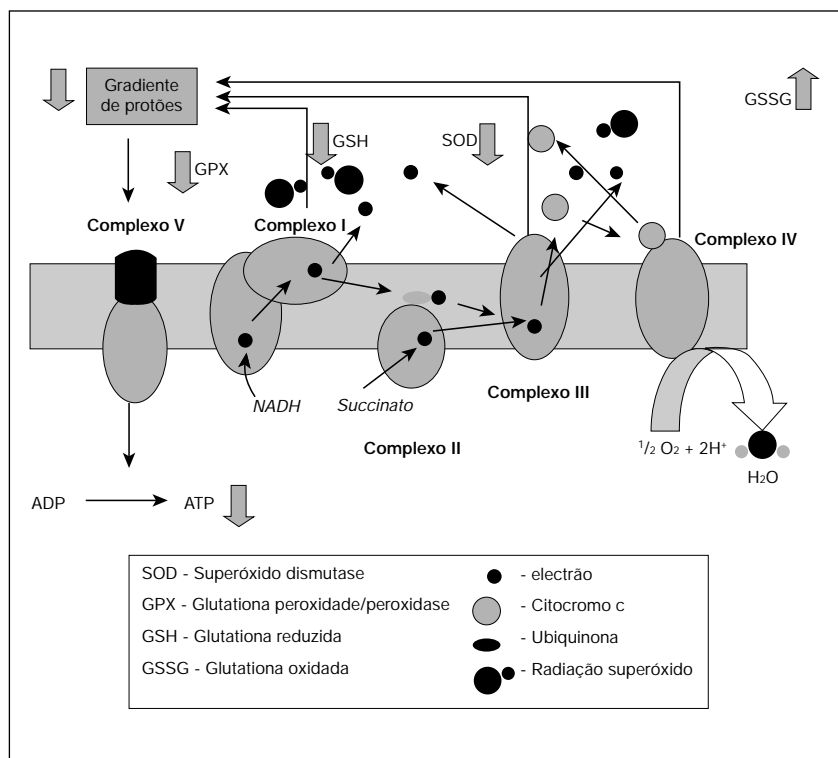
O_2^- em H_2O_2 e a GPX reduz o H_2O_2 a água (H_2O), utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como substrato, a qual é convertida em glutathiona oxidada (GSSG). Quando o O_2 é reintroduzido na reperfusão, ocorre um aumento da produção de O_2^- , não só a nível extramitocondrial, mas também ao nível da cadeia de transporte de electrões da mitocôndria⁽⁴¹⁾ (Fig. 2). Foi já demonstrado que a quantidade de O_2^- produzida nestes eventos depende da duração do período de isquemia e de reperfusão⁽⁴²⁾; paralelamente, a severidade e duração do período de hipóxia celular é importante na regulação dos níveis de enzimas antioxidantes e outros scavengers dos ROS o que, em última análise, irá determinar a extensão das lesões de reperfusão^(43, 44). Em modelos experimentais de IR, foi possível reduzir a produção mitocondrial de ROS utilizando inibidores da cadeia respiratória⁽⁴⁵⁾, mas não com o alopurinol (inibidor da xantina-oxidase, uma importante fonte de ROS de origem extra-mitocondrial)⁽⁴⁶⁾. As mitocôndrias submetidas a hipóxia-reoxigenação apresentam um decréscimo da eficiência da cadeia respiratória, secundário a lesões oxidativas (não só de proteínas da cadeia respiratória, mas também de lípidos membranares – lipoperoxidação – confirmada pela elevação do malondialdeído, um marcador deste fenómeno)⁽⁴⁷⁾. Estes processos poderão ser ainda mais devas-

ed with increased production of the hydroxyl radical (OH). These phenomena are important because 90% of the oxygen found in cardiac mitochondria immediately after reperfusion is in the form of OH⁽⁴⁹⁾. Mitochondrial ROS generation may also be stimulated by pro-inflammatory cytokines (such as tumor necrosis factor-TNF) that are elevated after IR⁽⁵⁰⁾.

This combination of oxidative stresses (increased ROS production and reduced antioxidant defenses) results in three main types of damage. The first is protein oxidation, particularly in the respiratory chain, leading to structural alterations (formation of crosslinks) and consequently inhibition of mitochondrial respiration, increased futile O_2 consumption and further reduction in ATP synthesis (compared to the ischemic period)⁽⁵¹⁾. This phenomenon may occur even during short periods of IR⁽⁵¹⁾. The second type of damage consists of alterations in lipid metabolism (β -oxidation of fatty acids and/or the activity of enzymes such as phospholipidases that control lipid catabolism)⁽⁵²⁾. Under these conditions lipoperoxidation occurs, particularly of phospholipids, with the formation of products such as 4-hydroxynonenal that can damage the integrity of mitochondrial membranes, increasing the permeability of the inner membrane⁽⁵³⁾. Furthermore, these products also alter membrane fluidity, thereby

Fig. 2 Representação esquemática das alterações estruturais e funcionais da cadeia respiratória durante a isquemia/reperfusão, conduzindo ao aumento da produção de ROS.

Fig. 2 Diagram of structural and functional alterations in the respiratory chain during ischemia/reperfusion, leading to increased production of ROS.



tadores pelo facto de, durante a reperfusão, ocorrer uma diminuição das defesas antioxidantes (SOD, GPX e GSH) ⁽⁴⁸⁾. A deficiência em SOD pode conduzir à formação de níveis perigosos de peroxinitrito (resultante da reação entre o O₂ e o óxido nítrico – NO) e baixos níveis de GSH associam-se a uma produção elevada do radical hidróxilo OH·. Estes fenómenos são importantes, pelo facto de 90% do O₂ presente nas mitocôndrias cardíacas logo após a reperfusão se encontrar na forma de OH· ⁽⁴⁹⁾. A produção mitocondrial de ROS pode também ser estimulada por citocinas pró-inflamatórias (como o *tumour necrosis factor* – TNF), as quais se encontram elevadas após IR ⁽⁵⁰⁾.

Deste duplo conjunto de stresses oxidativos (aumento da produção de ROS e redução das defesas antioxidantes) vão resultar três grandes tipos de lesões. A primeira consiste na oxidação de proteínas (sobretudo na cadeia respiratória), com alterações estruturais (formação de ligações cruzadas) e consequente inibição da respiração mitocondrial, aumento do consumo fútil de O₂ e maior redução da produção de ATP (em relação ao período isquémico) ⁽⁵¹⁾. Este fenómeno pode ocorrer mesmo durante breves períodos de IR ⁽⁵¹⁾. A segunda consiste na alteração do metabolismo lipídico (ao nível da β-oxidação dos ácidos gordos e/ou da actividade de enzimas que controlam o catabolismo lipídico, como as fosfolipidases) ⁽⁵²⁾. Esta situação leva a fenómenos de lipoperoxidação (nomeadamente ao nível dos fosfolípidos), com formação de produtos como o 4-hidroxinonal, capazes de lesar a integridade das membranas mitocondriais (daí resultando um aumento da permeabilidade da membrana interna) ⁽⁵³⁾. Para além disso, eles alteram também a fluidez membranar (daí resultando o agravamento da perturbação do transporte de electrões e um aumento da produção de H₂O₂) ⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾, e activam diversas cascatas de sinalização intercelular. Finalmente, pode também ocorrer a oxidação dos nucleótidos de piridina, com alteração da permeabilidade membranar, desacoplamento da fosforilação oxidativa e colapso da produção de ATP ^(58, 59).

Mas a reperfusão não é apenas sinónimo de lesões oxidativas, dado que o Ca²⁺ e o pH intracelular contribuem também para o impacto negativo final. A entrada excessiva de Ca²⁺ na mitocôndria durante a reperfusão ⁽⁶⁰⁾ pode também levar à inibição da fosforilação oxidativa e a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna ⁽³²⁾. Quanto ao pH

worsening disturbances in electron transport and increasing production of H₂O₂ ⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾, and trigger various intercellular signaling cascades. Finally, oxidation of pyridine nucleotides may occur, with changes in membrane permeability, uncoupling of oxidative phosphorylation and the collapse of ATP production ^(58, 59).

Besides oxidative damage, reperfusion has also a negative impact on intracellular pH and Ca²⁺ homeostasis. Excessive influx of Ca²⁺ into the mitochondrion during reperfusion ⁽⁶⁰⁾ can also lead to inhibition of oxidative phosphorylation and increased permeability of the inner mitochondrial membrane ⁽³²⁾. Intracellular pH falls during ischemia and rises again during reperfusion, which may hasten cell death, perhaps by increasing mitochondrial membrane permeability ⁽⁶¹⁾.

It is thus not surprising that, when isolated after a period of reperfusion, cardiac mitochondria show significant ultrastructural changes, including substantial accumulation of Ca²⁺ by exchange with sodium ions ⁽⁶²⁾ and generation of large quantities of ROS. These phenomena lead to significant alterations in proteins, lipids and mtDNA, that can culminate in the formation of pores in the structure of the mitochondrial membrane and subsequent mitochondrial dysfunction ⁽³¹⁾. However, despite all the data indicating that reperfusion-induced cell alterations are at least one of the causes of depressed myocardial function, it is unlikely that circulatory recovery (reperfusion) alone can explain all post-ischemic lesions. It is more likely that myocardial ischemia is accompanied by multiple severe metabolic disturbances, from which immediate recovery of contractile function is not to be expected, even when reperfusion does not cause additional damage ^(63, 64).

Mitochondria and cell death

Another important function of mitochondria is to modulate programmed cell death or apoptosis. This mechanism is essential throughout the life of any organism to eliminate “useless” cells in the absence of inflammatory mechanisms. However, excessive loss of cardiomyocytes through apoptosis ceases to be beneficial and can lead to acute or chronic heart failure.

There is now considerable evidence that mitochondria play a central role in regulating cell death by necrosis or apoptosis ⁽⁶⁵⁾. The multiple alterations that mitochondria undergo

intracelular, ele diminui durante a isquemia e volta a aumentar durante a reperfusão, o que pode acelerar a morte celular, talvez por estimular a permeabilidade membranar mitocondrial⁽⁶¹⁾.

Não é, pois, de estranhar que, quando isoladas após um período de reperfusão, as mitocôndrias cardíacas apresentem importantes alterações ultraestruturais, mostrando grande acumulação de Ca^{2+} (por troca com íons sódio)⁽⁶²⁾ e gerando uma grande quantidade de ROS. Estes fenômenos acabam por condicionar importantes alterações nas proteínas, lípidos e ADN_{mi} , podendo culminar na formação de poros na estrutura membranar mitocondrial, com a consequente disfuncionalidade mitocondrial⁽³¹⁾. Porém, apesar de todos os dados segundo os quais as alterações celulares induzidas pela reperfusão são pelo menos uma das causas de depressão funcional do miocárdio, é pouco provável que a recuperação circulatória (reperfusão) explique só por si todas as lesões pós-isquêmicas. É mais provável que a isquemia miocárdica se acompanhe de múltiplas perturbações metabólicas intensas, não sendo de esperar uma recuperação instantânea da função contráctil, mesmo quando a reperfusão não induz lesões adicionais^(63, 64).

Mitocôndrias e morte celular

Outra das funções importantes das mitocôndrias é modular a morte celular programada – a apoptose. A apoptose é um mecanismo necessário ao longo da vida de cada ser, a fim de suprimir células «inúteis», na ausência de mecanismos inflamatórios. Porém, a excessiva perda de cardiomiócitos através da apoptose deixa de ser benéfica e pode conduzir a insuficiência cardíaca aguda ou crónica.

Existem hoje numerosas evidências que apontam para um papel central das mitocôndrias na regulação da morte celular por necrose e apoptose⁽⁶⁵⁾. As múltiplas alterações mitocondriais subjacentes à IR podem, isoladamente ou em conjunto, desencadear apoptose⁽⁶⁵⁾. Diversos estudos demonstraram que a apoptose é precedida por alterações das membranas mitocondriais, levando à perda do normal gradiente electroquímico, desenvolvimento do fenómeno de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), produção de ROS e libertação de factores apoptóticos (como o citocromo *c* e o *apoptosis inducing factor* – AIF) para o citosol⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾. Dois mecanismos foram propostos para explicar a saída de citocromo *c* do

in IR can trigger apoptosis⁽⁶⁵⁾. Various studies have shown that apoptosis is preceded by changes in the mitochondrial membrane that result in the loss of the normal electrochemical gradient and lead to the phenomenon known as the mitochondrial permeability transition (MPT), production of ROS and release of apoptotic factors, such as cytochrome *c* and apoptosis-inducing factor (AIF), into the cytosol⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾. Two mechanisms have been proposed to explain the egress of cytochrome *c* from the mitochondrial intermembrane space. The first is the MPT, in which the outer membrane ruptures after mitochondrial swelling, which leads to the opening of non-specific high-conductance channels in the inner membrane, known as mitochondrial permeability transition pores. These cause the collapse of the transmembrane electrical potential and the loss of compounds with a mass of less than 1500 Dalton, not only cytochrome *c*, but also other important substances such as Ca^{2+} and GSH^(39, 69-71). The second mechanism is the transport of cytochrome *c* through specific pores formed from pro-apoptotic proteins, like Bax, inserted in the outer membrane, and from porines, components of the outer mitochondrial membrane. It is thought that some pro-apoptotic signals may induce the transport of Bax proteins to mitochondria and/or the activation of Bax proteins by another pro-apoptotic protein, Bid. In either case, this mechanism does not require any change in the properties of the inner mitochondrial membrane^(69, 72).

The evidence increasingly points to the greater importance of the MPT and the formation of pores in the mitochondrial membranes⁽⁷³⁻⁷⁵⁾. The precise nature of these pores is still poorly understood, but it may involve voltage-dependent anion channels, adenine nucleotide translocator (ANT) and matrix protein cyclophyllin^(32, 65, 76). The most important aspect of the MPT is that it may play a central role in cell death by either necrosis or apoptosis⁽⁷⁷⁾. It has been demonstrated that the MPT can be induced by conditions that may occur during IR, such as the accumulation of inorganic phosphate⁽⁷⁸⁻⁸¹⁾, oxidation of pyridine nucleotides^(58, 59), production of ROS^(32, 81), decrease/oxidation of GSH⁽⁵⁸⁾, the formation of sphingolipids⁽⁸²⁾ and lower matrix pH⁽⁶¹⁾.

Another important agent in the induction of apoptosis is Ca^{2+} . In heart tissue, a slight increase in intramitochondrial Ca^{2+} concentration

espaço intermembranar mitocondrial. O primeiro, consiste na ocorrência do fenómeno de TPM, com ruptura da membrana externa após o intumescimento das mitocôndrias, o qual conduz à abertura de canais inespecíficos de alta condutância na membrana interna (os chamados «poros transitórios de permeabilidade mitocondrial»), os quais vão ser responsáveis pelo colapso do potencial eléctrico transmembranar e pela perda de compostos com massa molecular inferior a 1500 Dalton (não só o citocromo *c*, mas também outras substâncias importantes, como o Ca^{2+} e a GSH)^(39, 69-71). O segundo mecanismo resulta do transporte do citocromo *c* através de poros específicos, formados por proteínas pró-apoptóticas inseridas na membrana externa – semelhantes à Bax – e por porinas, componentes da membrana mitocondrial externa. Pensa-se que alguns sinais apoptogénicos podem induzir a translocação de proteínas Bax para a mitocôndria e/ou a activação de proteínas Bax por outra proteína pró-apoptótica – a Bid. Em qualquer dos casos, este mecanismo não requer qualquer alteração das propriedades da membrana mitocondrial interna^(69, 72).

O peso da evidência tem apontado progressivamente para a maior importância do fenómeno de TPM e da formação de «poros» nas membranas mitocondriais⁽⁷³⁻⁷⁵⁾. A natureza exacta destes «poros» é ainda mal compreendida, mas poderia incluir, entre outros, o canal aniónico dependente de voltagem, o translocador de nucleótidos de adenina (ANT) e a proteína matricial ciclofilina^(32, 65, 76). A principal importância da TPM reside no facto de poder ser fulcral na morte celular, quer por necrose, quer por apoptose⁽⁷⁷⁾. Foi já demonstrado que a TPM pode ser induzida em condições que ocorrem durante a IR, como a acumulação de fosfato inorgânico⁽⁷⁸⁻⁸¹⁾, a oxidação de nucleótidos de piridina^(58, 59), a produção de ROS^(32, 81), a diminuição/oxidação de GSH⁽⁵⁸⁾, a formação de esfingolípidos⁽⁸²⁾ e o menor pH da matriz⁽⁶¹⁾.

Outro dos agentes importantes na indução da apoptose é o Ca^{2+} . No tecido cardíaco, um ligeiro aumento na concentração de Ca^{2+} intramitocondrial é utilizado para a activação da respiração mitocondrial. Porém, durante a isquemia (e sobretudo durante a reperfusão), a concentração de Ca^{2+} nas mitocôndrias eleva-se largamente^(83, 84). Diversos estudos têm sugerido que o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} pode induzir o fenómeno de TPM. De facto, quando o Ca^{2+} citosólico se eleva, a mito-

is used to activate mitochondrial respiration. However, during ischemia and even more during reperfusion, Ca^{2+} levels in mitochondria rise sharply^(83, 84). Several studies have suggested that increased intracellular Ca^{2+} concentrations can induce the MPT. When cytosolic Ca^{2+} rises, the mitochondrion increases its Ca^{2+} uptake, functioning as a sequestering system, in order to maintain the stability of cytosolic Ca^{2+} concentrations. This ability to sequester Ca^{2+} is limited by the fact that a rise in matrix Ca^{2+} above a certain threshold is a major factor in the formation of the above-mentioned high-conductance channels (pores), which cross the inner and outer mitochondrial membrane, causing dissipation of the mitochondrial electrical potential and loss of cytochrome *c* to the cytosol^(69, 85).

Irrespective of the underlying mechanism, the release of pro-apoptotic factors that are usually confined to the interior of the mitochondrion^(86, 87) triggers a sequence of events that begins with the binding of cytochrome *c* to apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1)^(24, 25, 86). In the presence of ATP, this complex converts procaspase 9 to caspase 9, which in turn cleaves procaspase 3 to caspase 3, triggering the “caspase cascade”^(86, 88). It can thus be inferred that apoptosis is an energy-dependent phenomenon and as such can only occur in cells with sufficient ATP reserves to maintain a process that consumes energy. We can thus state that apoptosis is programmed cell death in cells that have low energy reserves, while necrosis is the non-programmed death of cells with no energy reserves. It is also clear that the MPT can be associated with both necrosis and apoptosis, since what determines the type of cell death is not the MPT, but the availability or unavailability of energy to activate the caspase pathway (*Fig. 3*).

However, nothing that has been said alters the fact that mitochondria play a central role in the processes of cell death, since what ultimately lies behind those processes is the quantity of energy available, and in cardiomyocytes energy is synonymous with mitochondria. At the same time, apoptosis can be inhibited (probably via an antioxidant pathway) by various proteins, particularly some of the Bcl-2 family^(32, 65, 76, 89, 90), which are transferred to the outer mitochondrial membrane^(91, 92). Here also, the role of mitochondria is fundamental.

côndria aumenta a sua captação de Ca^{2+} , funcionando como sistema tampão, por forma a garantir a estabilidade das concentrações citosólicas de Ca^{2+} . Esta capacidade tamponizadora é limitada, uma vez que um aumento do Ca^{2+} matricial acima de certos limites constitui um importante indutor da formação dos referidos canais de alta condutância («poros»), os quais atravessam as membranas mitocondriais interna e externa, com dissipação do potencial eléctrico mitocondrial e perda de citocromo *c* para o citosol^(69, 85).

Independentemente do mecanismo subjacente, a libertação de factores pró-apoptóticos, habitualmente confinados ao interior da mitocôndria^(86, 87) vai desencadear uma sequência de eventos, a qual se inicia com a ligação do citocromo *c* ao *apoptosis protease-activating factor 1* (Apaf-1)^(24, 25, 86). Este complexo, na presença de ATP, converte a procaspase 9 em caspase 9, a qual, por sua vez, cliva a procaspase 3 em caspase 3⁽⁸⁸⁾, dando início à chamada «cascata das caspases»^(86, 88). Daqui se infere que a apoptose é um fenómeno dependente de energia e, como tal, só pode ocorrer em células com reservas de ATP suficientes para suportar um processo que consome energia. Pode então afirmar-se que a apoptose é a morte celular programada por células com baixos níveis de reservas energéticas, enquanto que a necrose é a morte não programada de células sem reservas energéticas. Igualmente se compreende que a TPM possa estar associada quer à necrose quer à apoptose, pois o que determina o tipo de morte celular não é a TPM, mas sim a disponibilidade ou não de energia para activar a via das caspases (*Fig. 3*).

Porém, nada do que atrás foi dito altera o facto de as mitocôndrias desempenharem um papel central nos processos de morte celular (pois o que lhes está, em última análise, subjacente, é a quantidade de energia disponível, e nos cardiomiócitos energia é sinónimo de mitocôndrias). Por outro lado, a apoptose pode ser inibida, provavelmente através de uma via antioxidante, por diversas proteínas, nomeadamente algumas da família Bcl-2^(32, 65, 76, 89, 90), as quais sofrem translocação para a membrana externa das mitocôndrias^(91, 92). Também aqui o papel das mitocôndrias volta a ser essencial.

Mitocôndrias e condicionamento isquémico

Se é verdade que as mitocôndrias estão intimamente relacionadas com a morte celular,

Mitochondria and ischemic preconditioning

Mitochondria also play an essential role in cellular defenses against several different types of aggression. One of the best examples is ischemic preconditioning (IPC). Described for the first time by Murry et al. in 1986⁽⁹³⁾, this is the protection that short periods of ischemia give against subsequent, more prolonged, ischemia or IR^(39, 94, 95). There is ample evidence that mitochondria produce ROS during periods of hypoxia⁽⁹⁶⁾. H_2O_2 appears to be one of the ROS involved in the induction of IPC, since the use of agents that reduce H_2O_2 production at the time of IPC results in the loss of the protective effect⁽⁹⁷⁾. Furthermore, ATP-dependent K^+ (K^+ -ATP) channels in the inner mitochondrial membrane open during IPC, increasing mitochondrial matrix volume and activating the oxidation of fatty acids⁽⁹⁸⁾, which leads to increased production of ROS^(99, 100). These channels, which control mitochondrial volume through K^+ flows and oxidation of fatty acids, appear to be involved in IPC⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾. The opening of these channels seems to involve the epsilon isoform of protein kinase C (PKC- ϵ)⁽¹⁰⁴⁾, preventing hyperpolarization of the mitochondrial electrical potential (induced by the excess P_i found during ischemia⁽¹⁰⁵⁾) and excessive accumulation of Ca^{2+} in the mitochondria⁽¹⁰⁶⁾, which may prevent the MPT and the release of cytochrome *c*⁽¹⁰⁷⁾. Dysfunction of these channels, such as occurs in diabetes, can affect this protective ability, which may partly explain the worse prognosis of coronary artery disease in diabetic patients^(108, 109).

Besides this form of IPC, known as classical, which confers powerful but short-lived protection against ischemia, a second “window” of IPC, called “late” IPC, has also been described^(110, 111), which begins around 24 hours after the first ischemic insult and lasts for around 72 hours⁽¹¹²⁾. Late IPC is able to protect the myocardium from irreversible damage and to attenuate myocardial stunning and post-ischemic endothelial dysfunction and, in some models, to reduce ventricular arrhythmias during IR⁽¹¹³⁾. The late form of IPC also appears to be triggered by the phosphorylation of important proteins by protein kinases, particularly protein kinase C (PKC). In this situation also, mitochondria appear to play an important role, through K^+ -ATP channels. The use of inhibitors of these channels leads to the suppression of late IPC, not only that induced by

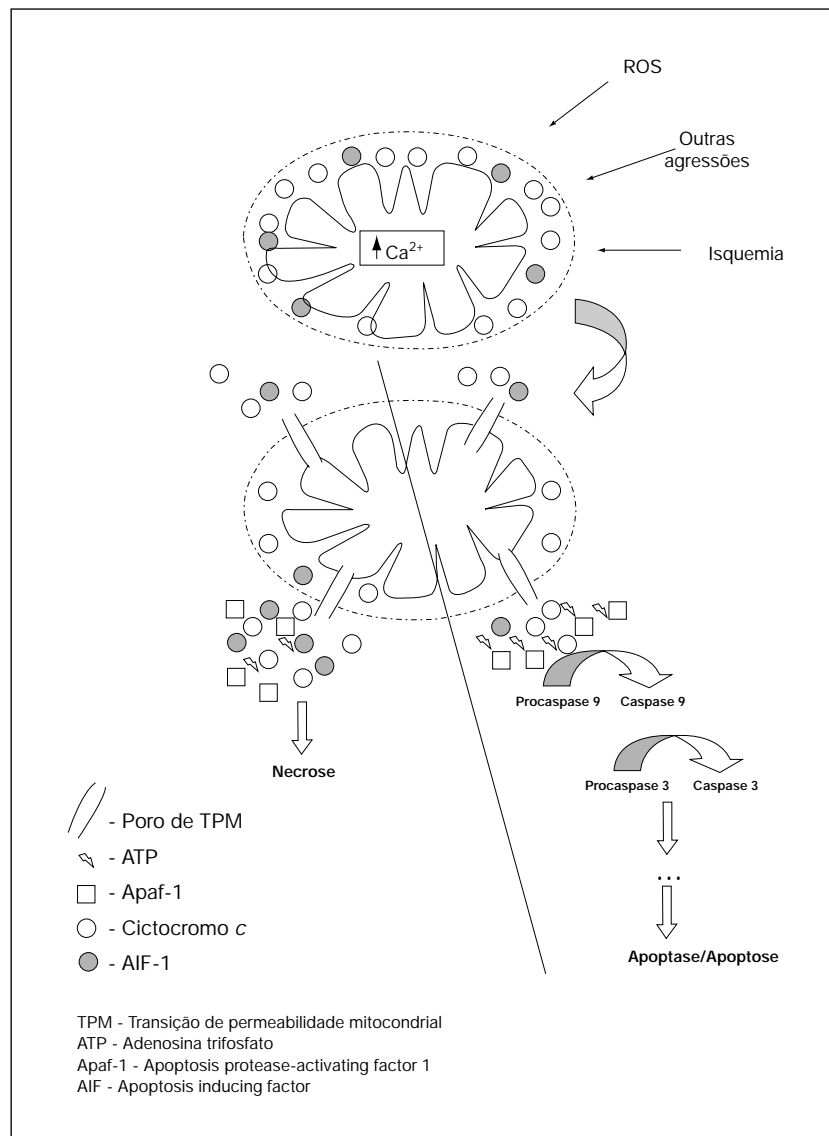


Fig. 3 Relação entre as mitocôndrias e a morte celular, demonstrando o papel crítico da quantidade de ATP na distinção entre a morte celular por necrose ou apoptose.

Fig. 3 Relation between mitochondria and cell death, demonstrating the crucial role of the quantity of ATP in distinguishing cell death by necrosis or apoptosis.

não é menos verdade que elas desempenham um papel essencial na defesa da célula contra inúmeras agressões. Um dos melhores exemplos disso mesmo é o condicionamento (PC) isquêmico. Referenciado pela primeira vez por Murry e colaboradores em 1986⁽⁹³⁾, consiste no facto de períodos breves de isquemia conferirem protecção contra um período subsequente de isquemia ou IR, de duração mais prolongada^(39, 94, 95). Existem abundantes evidências em como as mitocôndrias produzem ROS durante períodos de hipóxia⁽⁹⁶⁾. O H₂O₂ parece ser um dos ROS envolvida na indução do PC isquêmico, pois a utilização de agentes que reduzem a produção de H₂O₂ no momento do PC leva à perda da protecção conseguida⁽⁹⁷⁾. Além disso, os canais de K⁺ dependentes de ATP (K⁺-ATP) que existem na membrana mitocondrial interna, abrem durante o PC, aumentam o volume da

ischemia⁽¹¹⁴⁾, but also that induced by other agents, either constitutional, such as adenosine⁽¹¹⁵⁾ or opioids⁽¹¹⁶⁾, or those released as a result of ischemia, such as heat shock proteins⁽¹¹⁷⁾ or endotoxins⁽¹¹⁸⁾. The precise mechanism linking K⁺-ATP channels and late IPC is not yet fully understood, but, like classic IPC, it may involve nitric oxide^(113, 119), the production of ROS⁽¹¹³⁾ (which may activate nuclear factor κ B⁽¹²⁰⁾ – NF- κ B – or increase the activity of SOD⁽¹²¹⁾), and/or a mechanism dependent on protein kinase C⁽¹²²⁾. However, in late IPC, the activation of K⁺-ATP channels appears to be preceded by the activation of other kinases, particularly tyrosine kinases and mitogen-activated protein kinases (MAP-kinases), which activate inducible NO synthase (iNOS), with production of NO. This NO produced by iNOS, in a process possibly mediated by PKC, then opens the mito-

matriz mitocondrial e activam a oxidação de ácidos gordos⁽⁹⁸⁾, conduzindo, deste modo, a um aumento da produção de ROS^(99, 100). Estes canais, que controlam o volume mitocondrial através dos fluxos de K⁺ e da oxidação de ácidos gordos, parecem estar envolvidos no PC⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾. A sua abertura parece envolver a isoforma epsilon da proteína cinase C (PKC-ε)⁽¹⁰⁴⁾, impedindo a hiperpolarização do potencial eléctrico da mitocôndria (induzida pelo excesso de Pi presente durante a isquemia)⁽¹⁰⁵⁾ e evitando a excessiva acumulação mitocondrial de Ca²⁺⁽¹⁰⁶⁾, o que poderá evitar o fenómeno da TPM e a libertação de citocromo c⁽¹⁰⁷⁾. Quando estes canais sofrem disfunção, como acontece na diabetes, esta capacidade protectora pode ser afectada⁽⁹⁴⁾ (o que pode, em parte, explicar o pior prognóstico da doença coronária em diabéticos)^(108, 109).

Para além desta forma de PC (dita «clássica»), a qual confere uma potente protecção contra a isquemia (embora de curta duração), foi descrita uma segunda «janela» de PC (dito «tardio»)^(110, 111), a qual se inicia cerca de 24 horas apos o primeiro insulto isquémico e dura cerca de 72 horas⁽¹¹²⁾. O PC tardio é capaz de proteger o miocárdio de lesões irreversíveis, atenuar o fenómeno de «atordoamento» e a disfunção endotelial pós-isquémica e, em certos modelos, reduzir as arritmias ventriculares durante a IR⁽¹¹³⁾. Esta forma de PC tardio parece ser também desencadeada pela fosforilação de importantes proteínas, por acção de proteínas cinase (nomeadamente a PKC). Também nesta situação as mitocôndrias parecem desempenhar um papel importante, através dos canais K⁺-ATP. A utilização de inibidores destes canais leva à abolição do PC tardio, não só o induzido pela isquemia⁽¹¹⁴⁾, mas também o induzido por outros agentes, quer constitucionais (como a adenosina⁽¹¹⁵⁾ e os opioides⁽¹¹⁶⁾), quer libertados no contexto da isquemia (como proteínas de choque térmico⁽¹¹⁷⁾ e endotoxinas⁽¹¹⁸⁾). O mecanismo exacto da relação entre os canais K⁺-ATP e o PC tardio não é ainda totalmente conhecido, mas poderá envolver, tal como no PC clássico, o óxido nítrico^(113, 119), a produção de ROS⁽¹¹³⁾ (que podem activar o factor nuclear κB⁽¹²⁰⁾ – NF-κB – ou aumentar a actividade da SOD)⁽¹²¹⁾ e/ou um mecanismo dependente da PKC⁽¹²²⁾. Porém, no PC tardio, a activação dos canais K⁺-ATP parece ser precedida da activação de outras cinases, nomeadamente tirosina-cinases e *mitogen activated protein-kinases* (MAP-cinases), as quais activam a sintase in-

chondrial K⁺-ATP channels (*Fig. 4*). Late IPC also appears to occur in human myocardium⁽¹²³⁾, and some pilot studies indicate that the protection apparently shown by some patients with exercise-induced stable angina^(124, 125) or unstable pre-infarction angina⁽¹²⁶⁾ may be a form of late IPC. It has recently been demonstrated that nitroglycerine, a known nitric oxide donor, can induce late IPC both in animal models⁽¹²⁷⁾ and in humans⁽¹²⁸⁾.

CONCLUSIONS

Traditionally considered the powerhouses of the cell, mitochondria have been increasingly shown to be extremely complex organelles that participate actively, not only in the production of ATP, through oxidative phosphorylation, but also in other equally important metabolic processes, such as Ca²⁺ homeostasis, regulation of pH and cell volume, production and inactivation of ROS, and ultimately cell survival or death. Mitochondria cause many of the typical alterations found in ischemia and IR and are simultaneously one of their main targets. It now seems safe to say that mitochondria are at the heart of a complex cascade of events that determines the consequences of various types of aggressions against the cell, as well as of the defense mechanisms against these aggressions. Greater awareness of these facts is leading to an increasing recognition of the need for therapeutic strategies that will improve cardiomyocytes' defenses against such aggressions, which can only happen by preserving mitochondrial metabolism.

It was already known that the survival of cardiomyocytes was a question of energy. We now know that it is much more than this. If we really want to radically change the natural history of ischemic heart disease, we must develop more effective ways of protecting the myocardium's most valuable asset: its mitochondria.

GLOSSARY

ADP - adenosine diphosphate
ADP/O - adenosine diphosphate/oxygen
AIF - apoptosis-inducing factor
AMP - adenosine monophosphate
ANT - adenine nucleotide translocator
Apaf-1 - apoptosis protease-activating factor 1
ATP - adenosine triphosphate
Ca²⁺ - calcium

duto do NO (iNOS), com produção de NO. É esse NO produzido pela iNOS que, num processo eventualmente mediado pela PKC, vai então abrir os canais K^+ -ATP mitocondriais (Fig. 4). O PC tardio parece também ocorrer no miocárdio humano⁽¹²³⁾ e alguns estudos-piloto apontam para que a protecção que alguns doentes parecem exibir com episódios de angina estável (induzida pelo exercício)^(124, 125) e de angina instável pré-enfarte⁽¹²⁶⁾, poder corresponder a uma forma de PC tardio. Recentemente foi demonstrado que a nitroglicerina (um reconhecido dador de óxido nítrico) é capaz de induzir PC tardio, quer em modelos animais⁽¹²⁷⁾, quer em humanos⁽¹²⁸⁾.

CONCLUSÕES

Consideradas classicamente as «centrais energéticas» celulares, as mitocôndrias têm demonstrado cada vez mais serem organelos extremamente complexos, participando activamente, não só na produção de ATP via fosforilação oxidativa, como também noutros processos metabólicos não menos importantes e vitais, como sejam a homeostase do Ca^{2+} , a regulação do pH e volume celular, a produção e inactivação de ROS e, em última análise, na

Ca^{2+} -ATPases - calcium-adenosine triphosphatases
 CO_2 - carbon dioxide
 FAD - oxidized flavin adenine dinucleotide
 $FADH_2$ - reduced flavin adenine dinucleotide
 GPX - glutathione peroxidase
 GSH - reduced glutathione
 GSSG - oxidized glutathione
 H^+ - protons
 H_2O - water
 H_2O_2 - hydrogen peroxide
 iNOS - inducible nitric oxide synthase
 IPC - ischemic preconditioning
 IR - ischemia-reperfusion
 K^+ - potassium
 K^+ -ATP - adenosine triphosphate-dependent potassium channels
 MAP-kinases - mitogen-activated protein kinases
 MPP⁺ - 1-methyl-4-phenylpyridine
 MPT - mitochondrial permeability transition
 mtDNA - mitochondrial deoxyribonucleic acid
 NAD^+ - oxidized nicotinamide adenine dinucleotide
 NADH - reduced nicotinamide adenine dinucleotide
 NF- κ B - nuclear factor κ B
 NO - nitric oxide
 O_2 - oxygen
 O_2^- - superoxide radical
 OH^{\cdot} - hydroxyl radical
 pH - hydrogen potential
 Pi - inorganic phosphate
 PKC - protein kinase C

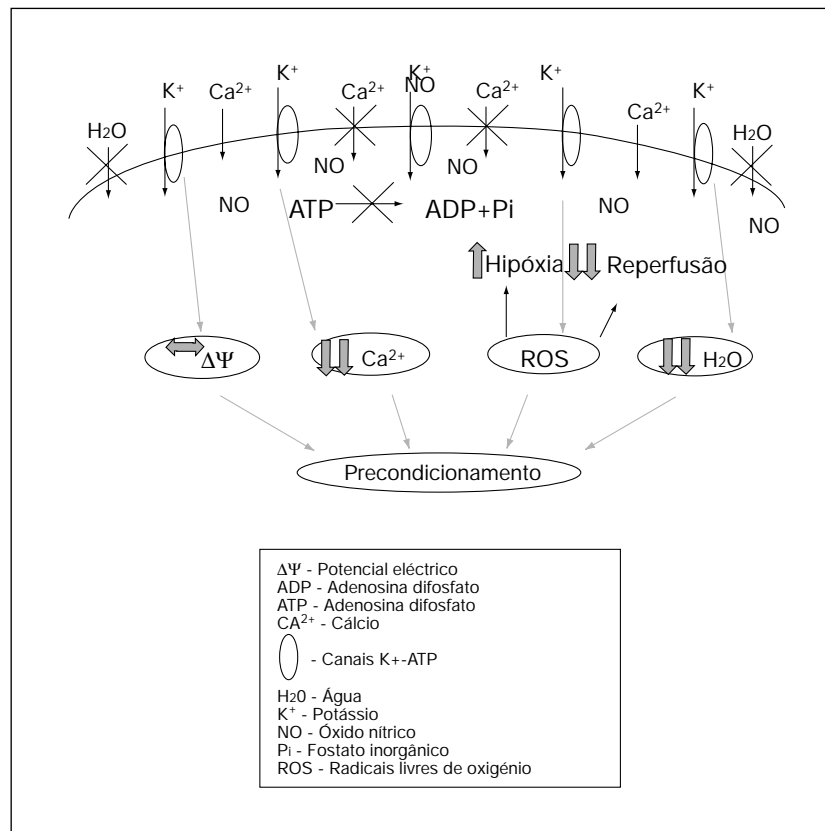


Fig. 4 Participação dos canais K^+ -ATP no fenómeno de preconditionamento.

Fig. 4 Participation of K^+ -ATP channels in the phenomenon of preconditioning.

determinação da sobrevivência ou morte celular. As mitocôndrias caracterizam-se por, simultaneamente, causarem muitas das alterações típicas da isquemia e IR e serem um dos seus principais alvos. Parece ser hoje seguro afirmar que as mitocôndrias estão no centro de uma complexa cascata de eventos que determina as consequências de variados tipos de agressões celulares, bem como o mecanismos de defesa perante estas agressões. A consciência destes factos leva a que, cada vez mais, se reconheça a necessidade de criar estratégias terapêuticas que permitam melhorar a defesa dos cardiomiócitos perante estas agressões. Tal só será possível preservando o metabolismo mitocondrial.

Já sabíamos que a sobrevivência dos cardiomiócitos era uma questão de energia. Sabemos agora que é também muito mais do que isso. Se de facto queremos mudar radicalmente a história natural da doença cardíaca isquémica, temos que desenvolver formas mais eficazes de proteger o que o miocárdio tem de mais precioso: as suas mitocôndrias.

GLOSSÁRIO

ADN_{mit} - ácido desoxirribonucleico mitocondrial.
ADP - adenosina difosfato.
ADP/O - adenosina difosfato/oxigénio.
AIF - *apoptosis inducing factor*.
AMP - adenosina monofosfato.
ANT - translocador de nucleótidos de adenina.
Apaf-1 - *apoptosis protease-activating factor 1*.
ATP - adenosina trifosfato.
Ca²⁺ - cálcio.
Ca²⁺-ATPases - cálcio-adenosina trifosfatases.
CO₂ - dióxido de carbono.
FAD - flavinamida adenina dinucleótido oxidada.
FADH₂ - flavinamida adenina dinucleótido reduzida.
GPX - glutathione peroxidase.
GSH - glutathione reduzida.
GSSH - glutathione oxidada.
H⁺ - protões.
H₂O - água.
H₂O₂ - peróxido de hidrogénio.
iNOS - sintase indutível do óxido nítrico.
IR - isquemia-reperfusão.
K⁺ - potássio.
K⁺-ATP - canais de potássio dependentes de adenosina trifosfato.
MAP-kinases - *mitogen activated protein-kinases*.
MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridina.
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleótido oxidada.
NADH - nicotinamida adenina dinucleótido reduzida.
NF-κB - factor nuclear κB.
NO - óxido nítrico.
O₂ - oxigénio.
O₂⁻ - radical superóxido.

PKC-ε - epsilon isoform of protein kinase C

ROS - reactive oxygen species (free oxygen radicals)

SOD - superoxide dismutase

TNF - tumor necrosis factor

OH⁻ - radical hidróxilo.
PC - condicionamento.
pH - potencial hidrogeniônico.
Pi - fosfato inorgânico.
PKC - proteína cinase C.
PKC-ε - isoforma epsilon da proteína cinase C.
ROS - radicais livres de oxigênio.
SOD - superóxido dismutase.
TNF - *tumour necrosis factor*.
TPM - transição de permeabilidade mitocondrial.

Pedido de separatas para:

Address for reprints:

LINO GONÇALVES

Serviço de Cardiologia

Hospitais da Universidade de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 COIMBRA

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Ganz P, Braunwald E. Coronary blood flow and myocardial ischemia. In: Braunwald E, ed. Heart Disease – A Textbook of Cardiovascular Medicine. Philadelphia: W B Saunders 2000;1265-90.
2. Grynerg A, Demaison L. Fatty acid oxidation in the heart. J Cardiovasc Pharmacol 1996;28 (Suppl 1):S11-S17.
3. Grynberg A. Role of membrane lipids in myocardial cytoprotection. Arch Mal Coeur Vaiss 2000;93:175-82.
4. Kantor PF, Lucien A, Kozak R, et al. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. Circ Res 2000;86:487-9.
5. Spedding M, Tillement JP, Morin D, et al. Medicines interacting with mitochondria: anti-ischemic effects of trimetazidine. Therapie 1999;54:627-35.
6. Rahimtoola SH. A perspective on three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. Circulation 1985;72 (Suppl.V):123-35.
7. Berry GJ, Masek M. The pathology of hibernating myocardium. Nucl Med Commun 2002;23:303-9.
8. Hearse JD. Myocardial ischemia: can we agree on a definition for the 21st century? Cardiovasc Res 1994;28:1737-44.
9. Gerber BL, Wijns W, Vanoverschelde JL et al. Myocardial perfusion and oxygen consumption in reperfused non-infarcted dysfunctional myocardium after unstable angina: direct evidence for myocardial stunning in humans. J Am Coll Cardiol 1999;34:1939-46.
10. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. Physiol Rev 1999;79:609-34.
11. Sheehan FH, Doerr R, Schmidt WG, et al. Early recovery of left ventricular function after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: an important determinant of survival. J Am Coll Cardiol 1988;12:289-300.
12. Dispersyn GD, Borgers M, Flameng W. Apoptosis in chronic hibernating myocardium: sleeping to death? Cardiovasc Res 2000;45:696-703.
13. Bolli R, Triana JF, Jeroudi MO. Prolonged impairment of coronary vasodilation after reversible ischemia: Evidence for microvascular “stunning”. Circ Res 1990;67:332-43.
14. Krause SM, Jacobus WE, Becker LC. Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic “stunned” myocardium. Circ Res 1989;65:526-30.
15. Lazdunski M, Frelin C, Frelin P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. J Mol Cell Cardiol 1985;17:1029-42.
16. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function on reperfused ischemic rat hearts: Possible involvement of H⁺-Na and Na⁺-Ca²⁺ exchange. Circ Res 1989;65:1045-56.
17. Przyklenk K, Kloner RA. Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the “stunned” myocardium. Cir Res 1986;58:148-56.
18. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, et al. Iron-mediated radical reactions upon reperfusion contribute to myocardial “stunning”. Am J Physiol 1990;259:H1901-H1911.
19. Koerner JE, Anderson BA, Dage RC. Protection against post-ischemic myocardial dysfunction in anesthetized rabbits with scavengers of oxygen-derived free radicals: superoxide dismutase plus catalase, N-2-mercapto-propionyl glycine and captopril. J Cardiovasc Pharmacol 1991;17:185-91.
20. Dage RC, Anderson BA, Mao STJ, et al. Probuocol reduces myocardial dysfunction during reperfusion after short-term ischemia in rabbit heart. J Cardiovasc Pharmacol 1991;17:158-65.
21. Ellis SG, Wynne J, Braunwald E, et al. Response of reperfusion-salvaged stunned myocardium to inotropic stimulation. Am Heart J 1984;107:13-9.
22. Arnold JM, Braunwald E, Sandor T et al. Inotropic stimulation of reperfused myocardium with dopamine: Effects on infarct size and myocardial function. J Am Coll Cardiol 1985;6:1026-34.
23. Heusch G, Schafer S, Kroger K. Recruitment of inotropic reserve in “stunned” myocardium by the cardiotonic agent AR-L 57. Basic Res Cardiol 1988;83:602-10.
24. Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of Cytochrome c from mitochondria blocked. Science 1997;275:1129-31.

25. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, et al. The release of Cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-6.
26. Darley-USmar V, Ragan I, Smith P, et al. The proteins of the mitochondrial inner membrane and their role in oxidative phosphorylation. In: Darley-USmar V, Schapira AHV, eds. *Mitochondria: ADN, Proteins and Disease*. London, Portland Press 1994;1-25.
27. Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, et al. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 1990;265: 16330-6.
28. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10771-8.
29. Beal MF. Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 1995;38:357-66.
30. Beal MF. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol* 1998;44:S110-S114.
31. Ferrari R. The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28 (Suppl 1):S1-S10.
32. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999;341:233-49.
33. Jennings RB, Reimer KA, Hill ML et al. Total ischemia in dog hearts in vitro. I. Comparison of high energy phosphate production, utilization and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circ Res* 1981;49:892-900.
34. Doumen C, Wan B, Ondrejickova O. Effect of BDM, verapamil and cardiac work on mitochondrial membrane potential in perfused rat hearts. *Am J Physiol* 1995;269:H515-H523.
35. Jones DR, Abbott AE, Hill RC, et al, Gustafson RA, Murray GF. Preservation of adenosine 5'-triphosphate and mitochondrial function during hypercalcemic reperfusion using verapamil cardioplegia. *Chest* 1995;107:307-10.
36. Lehninger AL. Ca²⁺ transport by mitochondria and its possible role in cardiac contraction-relaxation cycle. *Circ Res* 1974;35 (Suppl 3):83-90.
37. Sedlis SP, Corr PB, Sobel BE et al. Lysophosphatidyl choline potentiates Ca²⁺ accumulation in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1983;244:H32-H38.
38. Nayler WG. The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am J Pathol* 1981;102:262-70.
39. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, et al. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2002;73:493-9.
40. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527.
41. Morin D, Hauet T, Spedding M, et al. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;49:151-74.
42. Ratyck RE, Chuknyiska RS, Bulkley GB. The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. *Surgery* 1987;102:122-31.
43. Kirshenbaum LA, Singal PK. Antioxidant changes in heart hypertrophy: significance during hypoxia-reoxygenation injury. *Can J Physiol Pharmacol* 1992;70:1330-35.
44. Murphy BJ, Robin ED, Tapper DP, et al. Hypoxic coordinate regulation of mitochondrial enzymes in mammalian cells. *Science* 1984;223:707-9.
45. Gonzalez-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subject to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993;91:456-64.
46. Caraceni P, Ryu HS, Van Thiel DH, Borle AB. Source of oxygen free radicals produced by rat hepatocytes during post-tanoxic reoxygenation. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1268: 249-54.
47. Schild L, Reinheckel T, Winswedel I, et al. Short-term energy production in isolated rat mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification. *Biochem J* 1997;328:205-10.
48. Schlafer M, Meyers CL, Adkins S. Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia. *J Moll Cell Cardiol* 1987;19:1195-206.
49. Das DK, George A, Liu XK, et al. Detection of hydroxyl radical in mitochondria of ischemic-reperfused myocardium by trapping with salicylate. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;16:1004-9.
50. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, et al. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1997;272:11369-77.
51. Reinheckel T, Korn S, Mohring S, et al. Adaptation of protein carbonyl detection to the requirements of proteome analysis demonstrated for hypoxia/reoxygenation in isolated rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 2000;376:59-65.
52. Ford DA. Alterations in myocardial lipid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Prog Lipid Res* 2002;41:6-26.
53. Chen JJ, Yu BP. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Rad Biol Med* 1994;17:411-8.
54. Chen X, Gross RW. Phospholipid subclass-specific alterations in the kinetics of ion transport across biologic membranes. *Biochemistry* 1994;33:13769-74.
55. Pak JH, Bork VP, Norberg et al. Disparate molecular dynamics of plasmalogen and phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* 1987; 26:4824-30.
56. Lamers JM, Stinis HT, Monfoort A, et al. The effect of lipid intermediates on Ca²⁺ and Na⁺ permeability and (Na⁺ + K⁺)-ATPase of cardiac sarcolemma. A possible role in myocardial ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1984; 774:127-37.
57. Chen X, Gross RW. Potassium flux through gramicidin ion channels is augmented in vesicles comprised of plasmalogen: correlations between gramicidin conformation and function in chemically distinct host bilayer matrices. *Biochemistry* 1995;34:7356-64.
58. Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, et al. Modulation of mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem* 1996;271:6746-51.
59. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, et al. Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol* 1997;272:C1286-C1294.
60. Delcamp TJ, Dales C, Ralenkotter L, et al. Intramitochondrial [Ca²⁺] and membrane potential in ventricular myocytes exposed to anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998;275:H484-H494.
61. Qian T, Nieminen AL, Herman B, et al. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997;273: C1783-C1792.
62. Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS et al. Mitochondrial calcium transport pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 1998;39: 423-33.
63. Bolli R. Postischemic myocardial stunning. In Yellon DM and Jennings RB (eds.): *Myocardial Protection: The Pathophysiology of Reperfusion and Reperfusion Injury*. New York, Raven Press 1992.
64. Hearse DJ. Stunning: A radical re-view. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991;5:853-76.
65. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulation in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:619-42.

66. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 1996;384:53-7.
67. Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Marchetti P, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Biol Toxicol* 1998;14:141-5.
68. Skulachev VP. Mitochondria in the programmed death phenomena: A principle of biology: "It is better to die than to be wrong". *IUBMB Life* 2000;49:365-73.
69. Skulachev VP. How proapoptotic proteins can escape from mitochondria? *Free Rad Biol Med* 2000;29:1056-9.
70. Bernardi P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta* 1996;1275:5-9.
71. Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:33-50.
72. von Ahlsen O, et al. Preservation of mitochondrial membrane structure and function after Bid or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 2000;123:44-8.
73. Zoratti M, Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995;1241:139-76.
74. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* 1997;17:43-52.
75. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiol Rev* 1999;79:1127-55.
76. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-9.
77. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. The permeability pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2 related proteins. *J Exp Med* 1998;187:1261-71.
78. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Grijalba MT, Bechara EJ, Vercesi AE. Effect of inorganic phosphate concentration on nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. *J Biol Chem* 1996;271:2929-34.
79. Baker JE, Felix CC, Olinger GN, Kalyanaram B. Myocardial ischemia and reperfusion: direct evidence for free radical generation by electron spin resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2786-9.
80. Kristián T, Siesjö BK. Calcium-related damage in ischemia. *Life Sci* 1996;59:357-67.
81. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995;182:367-77.
82. Arora AS, Jones BJ, Patel TC, Bronk SF, Gores GJ. Ceramide induces hepatocytes cell death through disruption of mitochondrial function in the rat. *Hepatology* 1997;25:958-63.
83. Doliba NM, Doliba NM, Chang Q et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation in heart from stressed cardiomyopathic hamsters. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:543-53.
84. Altschuld RA. Intracellular calcium regulatory system during ischemia and reperfusion. *EXS* 1996;76:87-97.
85. Frey TG and Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *TIBS* 2000;15:319-24.
86. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extract; requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-57.
87. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.
88. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiate an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
89. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.
90. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, et al. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995;9:1277-87.
91. Hockenbery DM, Oltavi ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-51.
92. Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:127-37.
93. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
94. Ghosh S, Standen NB, Galifianes M. Failure to precondition pathological human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:711-8.
95. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, et al. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998;66:152-7.
96. Chance B, Williams GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj* 1956;17:65-134.
97. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, et al. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998;273:18092-8.
98. Grover CJ, Garlid KD. ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:677-95.
99. Garlid KD. Opening mitochondrial KATP channel in the heart – what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol* 2000;95:275-9.
100. Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial KATP channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Cir Res* 2000;87:460-6.
101. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 1998;97:2463-9.
102. Garlid K, Paucek P, Yarov-Yarovsky V, et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels: a possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 1997;81:1072-82.
103. Ghosh S, Standen NB, Galifianes M. Evidence for mitochondrial KATP channels as effectors of human myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res* 2000;45:934-40.
104. Ohnuma Y, Miura T, Miki T, et al. Opening of mitochondrial KATP channel occurs downstream of PKC-ε activation in the mechanism of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H440-H447.
105. Koretsune Y, Marban E. Mechanism of ischemic contracture in ferret hearts: relative roles of [Ca²⁺]_i elevation and ATP depletion. *Am J Physiol* 1990;258:H9-C16.
106. Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, et al. Preconditioning limits mitochondrial Ca(2+) during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. *Am J Physiol* 2001;280:H2321-H2328.
107. Korge P, Honda HM, Weiss JN. Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3312-7.
108. Kannell WB. Role of diabetes in cardiac disease: conclusion from population studies. In: Zonaraich S, ed. *Diabetes and the heart*. Springfield, Illinois: Thomas Publishers, 1978:97-112.
109. Stone PH, Muller JE, Hartwell T. The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to adverse prognosis. The MILIS study group. *J Am Coll Cardiol* 1989;14:49-57.

110. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 1993;72:1293-9.
111. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:1264-72.
112. Pagliaro P, Gattullo D, Rastaldo R, Losano G. Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection. *Life Sci* 2001;69:1-15.
113. Baxter GF, Ferdinandy P. Delayed preconditioning of myocardium: current perspectives. *Basic Res Cardiol* 2001;96:329-44.
114. Takano H, Tang XL, Bolli R. Differential role of K(ATP) channels in late preconditioning against myocardial stunning and infarction in rabbits. *Am J Physiol* 2000;279:H2350-H2359.
115. Baxter GF, Yellon DM. ATP-sensitive K⁺ channels mediate the delayed cardioprotective effect of adenosine A1 receptor activation. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:981-9.
116. Fryer RM, Hsu AK, Eells JT, Nagase H, Gross GJ. Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial KATP channels. *Circ Res* 1999;84:846-51.
117. Pell TJ, Yellon DM, Goodwin RW, Baxter GF. Myocardial ischemic tolerance following heat stress is abolished by ATP-sensitive potassium channel blockade. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997;11:679-86.
118. Mei DA, Elliott GT, Gross GJ. KATP channels mediate late preconditioning against infarction produced by monophosphoryl lipid A. *Am J Physiol* 1996;271:H2723-H2729.
119. Qiu Y, Rizvi A, Tang XL, et al. Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am J Physiol* 1997;273:H2931-H2936.
120. Schreck R, Rieber P, Bauerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-58.
121. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 1998;25:434-56.
122. Takashi E, Wang Y, Ashraf M. Activation of mitochondrial K(ATP) channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 1999;85:1146-53.
123. Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Preconditioning the human myocardium by simulated ischemia: studies on the early and delayed protection. *Cardiovasc Res* 2000;45:339-50.
124. Bilinska M, Rudnicki S, Beresewicz A. Delayed attenuation of myocardial ischemia with repeated exercise in subjects with stable angina: a possible model for the second window of protection? *Basic Res Cardiol* 2000;95:418-23.
125. Dana A, Carroll R, Walker JM, Yellon DM. Exercise-induced ischaemia causes both early and delayed myocardial adaptation during repeated exercise: a role for adenosine? *Eur Heart J* 2000;21(suppl):366 (abstract).
126. Yellon DM, Dana A. The preconditioning phenomenon: a tool for the scientist or a clinical reality? *Circ Res* 2000;87:543-50.
127. Hill M, Takano H, Tang XL, Kodani E, Shirk G, Bolli R. Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits despite development of nitrate tolerance. *Circulation* 2001;104:694-9.
128. Leesar MA, Stoddard MF, Dawn B, Jasti VG, Masden R, Bolli R. Delayed preconditioning-mimetic action of nitroglycerin in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation*. 2001;103:2935-41.