

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

LEONARDO DE MOURA ALVORCEM

**O SULFETO DE HIDROGÊNIO E O ÁCIDO ETILMALÔNICO, METABÓLITOS  
ACUMULADOS NA ENCEFALOPATIA ETILMALÔNICA, INDUZEM DISFUNÇÃO  
BIOENERGÉTICA E ABERTURA DO PORO DE TRANSIÇÃO DE  
PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL EM CEREBELO DE RATOS**

Porto Alegre

2021

Leonardo de Moura Alvorcem

**O SULFETO DE HIDROGÊNIO E O ÁCIDO ETILMALÔNICO, METABÓLITOS  
ACUMULADOS NA ENCEFALOPATIA ETILMALÔNICA, INDUZEM  
DISFUNÇÃO BIOENERGÉTICA E ABERTURA DO PORO DE TRANSIÇÃO  
DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL EM CEREBELO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Porto Alegre

2021



## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), por me formar um excelente profissional de forma gratuita e de me proporcionar momentos especiais e muitos alegres durante minha formação.

Ao Departamento de Bioquímica, por me fornecer todo o material e estrutura necessária para o desenvolvimento do projeto, assim como aos professores e profissionais que trabalham e ajudam diariamente no mantimento do departamento.

À Secretaria do PPG da Bioquímica, especialmente ao Giordano, Cléia e ao Douglas, pois sempre me ajudaram de forma eficiente e por ser muito bem acolhido por estes.

Ao Prof. Moacir Wajner, pelo carinho e todo o conhecimento transmitido para a minha vida profissional durante esses anos de laboratório.

Aos meus colegas de laboratório do 27, 34, 38. Em especial ao Nevtton e ao Nicolas, por sempre estarem dispostos a ajudar em qualquer horário nos experimentos realizados.

A todos os amigos do departamento que tive a oportunidade de compartilhar conhecimentos e risadas, sempre pessoas de bom coração e humor.

A Renata, por estar sempre presente em qualquer momento que precisei durante o meu doutorado. E por ser essa pessoa incrível e companheira que me ajuda diariamente tanto na vida profissional como na vida pessoal.

A Bianca, pois sempre me serviu de inspiração como profissional e que sempre

parou o que estava fazendo para ajudar no laboratório, mesmo que fosse nas coisas pequenas. Além de sempre se disponibilizar para ajudar nos experimentos com alegria e bom humor

Ao meu professor e orientador Prof. Guilhian Leipnitz. Se hoje sou um profissional competente e realizado com os meus fazeres, tenho de agradecer ao meu professor, pois sempre teve PACIÊNCIA com as minhas birras e chatices, assim como com os meus momentos de hiperatividade de ir incomodá-lo no gabinete. Agradeço por ser este grande amigo que é, pois sempre me ajudou nos piores e nos melhores momentos no laboratório e na vida. Muito obrigado por ter me aceito como seu primeiro aluno de IC, mesmo talvez até hoje não entendo por que me deixaste entrar. Obrigado por tudo.

Aos meus pais e meu irmão pelo apoio que me dão a vida inteira. Agradeço por sempre me motivarem em meus momentos de tristeza, e por nunca me impedirem de fazer algo, mesmo que este fosse contra o princípio deles. Agradeço ao carinho e a forma de amor que me mostram todos os dias, obrigado por serem essas pessoas tão especiais em minha vida.

A Laila, pois sempre que chego em casa me recebe com carinho e beijos, não importa o meu momento.

A MJ, pois sempre em momentos de angústia e ansiedade me ajudou a não perder a cabeça e sempre em tentar relaxar para manter o foco no futuro.

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	<b>1</b>
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
I.1. INTRODUÇÃO .....	8
I.1.1 Catabolismo de Aminoácidos Sulfurados.....	8
I.1.2 Encefalopatia Etilmalônica.....	10
I.1.2.1 Achados bioquímicos e diagnóstico.....	10
I.1.2.2 Sintomatologia e Achados Neuropatológicos.....	11
I.1.2.3 Tratamento.....	12
I.1.2.4 Fisiopatologia.....	12
I.1.3 Metabolismo Energético Cerebral.....	14
I.1.4 Fosforilação Oxidativa.....	15
I.1.5 $\alpha$ -Cetoglutarato Desidrogenase ( $\alpha$ -KGDH) .....	16
I.1.6 Homeostase Mitocondrial.....	17
I.1.7 Radicais Livres e Espécies Reativas.....	18
I.1.8 Defesas Antioxidantes.....	19
I.1.9 Estresse Oxidativo.....	20
2.1 Justificativa e Objetivos.....	21
2.1.1 Justificativa e Objetivo Geral.....	21
2.1.2 Objetivos Específicos.....	22
<b>PARTE II</b> .....	<b>24</b>

Capítulo I.....	25
Capítulo II.....	36
<b>PARTE III.....</b>	<b>81</b>
III.1. Discussão.....	82
III.2. Conclusões.....	97
III.3. Perspectivas.....	98
Referências.....	98
Anexo I.....	106

**PARTE I**  
***Introdução e Objetivos***

## RESUMO

A encefalopatia etilmalônica (EE) é uma doença genética grave de sintomatologia predominantemente neurológica, e bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo tecidual de sulfeto de hidrogênio (sulfeto) e ácido etilmalônico (EMA). Visto que a fisiopatologia do dano cerebelar observado em pacientes acometidos pela EE não está estabelecida, avaliamos os efeitos do sulfeto e do EMA sobre parâmetros de bioenergética mitocondrial, poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) e homeostase redox em cerebelo de ratos. Observamos que o sulfeto e o EMA diminuíram a respiração mitocondrial, prejudicando a transferência de elétrons e a fosforilação oxidativa. Além disso, ambos metabólitos induziram inchamento mitocondrial e diminuíram o potencial de membrana e a capacidade de retenção de cálcio em mitocôndrias de cerebelo, efeitos que foram prevenidos pela combinação de ciclosporina A e ADP, e pelo vermelho de rutênio, sugerindo indução da abertura do PTPM. No caso dos efeitos apenas do sulfeto, a adição de melatonina, um antioxidante, e N-etilmaleimida, um agente alquilante de grupamentos tiois, também preveniu as alterações mitocondriais induzidas por esse metabólito. O sulfeto ainda diminuiu o potencial de membrana mitocondrial e causou morte celular em culturas de neurônios cerebelares, efeitos que também foram prevenidos por ciclosporina A e melatonina. Esses resultados sugerem que o sulfeto induz a abertura do PTPM via modificação de grupamentos tiois e geração de espécies reativas de oxigênio. No que se refere aos efeitos do EMA, foi observado que esse ácido inibiu de forma mista a atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e aumentou o efluxo mitocondrial de  $\alpha$ -cetoglutarato, os quais explicam o dano à respiração mitocondrial na presença de glutamato como substrato. Nos experimentos onde succinato foi usado como substrato, foi verificado que a diminuição da respiração mitocondrial pelo EMA foi

prevenida pela adição de succinato exógeno, e atenuada pela permeabilização das mitocôndrias, indicando que o EMA altera o transporte mitocondrial de succinato. Simulações *in silico* também evidenciaram que o EMA afeta o transporte mitocondrial tanto de succinato quanto de glutamato. Finalmente, foi verificado que altas concentrações de EMA aumentaram os níveis de superóxido e alteraram as defesas antioxidantes de forma moderada. Nossos resultados indicam que prejuízos na bioenergética mitocondrial e abertura do PTPM induzidos pelo sulfeto e EMA são mecanismos potencialmente envolvidos na fisiopatologia das anormalidades cerebelares vistas na EE. Além disso, uma vez que elevadas concentrações do EMA induziram estresse oxidativo, pode ser sugerido que esse mecanismo também contribui para a progressão da EE durante episódios de descompensação metabólica, que são caracterizados por aumento acentuado dos níveis dos metabólitos acumulados.

**Palavras-chave:** Encefalopatia etilmalônica, sulfeto de hidrogênio, ácido etilmalônico, bioenergética, poro de transição de permeabilidade mitocondrial, cerebelo.

## ABSTRACT

Ethylmalonic encephalopathy (EE) is a genetic disease with severe neurological symptoms and biochemically characterized by tissue accumulation of hydrogen sulfide and ethylmalonic acid (EMA). Since the pathophysiology of cerebellar abnormalities observed in EE has not been studied, we evaluated the effects of hydrogen sulfide and EMA on mitochondrial bioenergetics, mitochondrial permeability transition pore and redox homeostasis in cerebellum of young rats. Sulfide and EMA decreased mitochondrial respiration supported by NADH- and FADH<sub>2</sub>-linked substrates. In addition, both metabolites induced mitochondrial swelling and decreased mitochondrial membrane potential and calcium retention capacity in mitochondrial fractions, which were prevented by the combination of cyclosporine A and ADP, as well as by ruthenium red, suggesting induction of mitochondrial permeability transition pore opening. The addition of melatonin and N-ethylmaleimide also prevented these sulfide-induced mitochondrial changes. Sulfide further reduced the mitochondrial membrane potential and caused cell death in cerebellar neurons, which were also prevented by cyclosporine A and melatonin. These results suggest that sulfide induces mitochondrial permeability transition opening via modification of thiol groups and generation of reactive oxygen species. Regarding EMA effects, it was also observed that this acid inhibited the activity of  $\alpha$ -KGDH in a mixed profile and increased the mitochondrial efflux of  $\alpha$ -ketoglutarate, which explain the EMA-induced mitochondrial respiration decrease in the presence of glutamate as substrate. Furthermore, our data showed that the decreased respiration caused by EMA with succinate was prevented by the addition of exogenous succinate, and attenuated by the permeabilization of mitochondria, implying that the mitochondrial transport of succinate is affected by EMA. *In silico* simulations also demonstrated that EMA disturbs the mitochondrial

transport of both succinate and glutamate. Finally, it was found that EMA, at high concentrations, mildly increased the levels of superoxide and altered the antioxidant defenses in cerebellum. Our results indicate that mitochondrial bioenergetic disruption and PTPM opening induced by sulfide and EMA contribute to the pathophysiology of cerebellar abnormalities seen in EE. Additionally, since high levels of EMA induced oxidative stress, it is conceivable that this pathomechanism also contributes to EE pathogenesis during episodes of metabolic decompensation, which are characterized by marked elevation of accumulating metabolites.

**Keywords:** Ethylmalonic encephalopathy, hydrogen sulfide, ethylmalonic acid, bioenergetics, mitochondrial permeability transition pore, cerebellum.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ -KGDH – Alfa-Cetogluturato Desidrogenase

ACO – Aconitase

ADP – Adenosina-5'-Difosfato

ATP – Adenosina-5'-Trifosfato

CAC – Ciclo do Ácido Cítrico

CAT – Catalase

COX – Citocromo c Oxidase

CTE – Cadeia Transportadora de Elétrons

EE – Encefalopatia Etilmalônica

EMA – Ácido Etilmalônico

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GDH – Glutamato Desidrogenase

GPx – Glutaciona Peroxidase

GR – Glutaciona Redutase

GSH – Glutaciona Reduzida

GST – Glutaciona S-Transferase

G6PDH – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

H<sub>2</sub>S – Sulfeto de Hidrogênio

MC – carreadores (transportadores) mitocondriais

MDH – Malato Desidrogenase

mPT – Poro de Transição Mitocondrial

PTPM – Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial

MSA – Ácido Metilsuccínico

NAC – N-acetilcisteína

SDH – Succinato Desidrogenase

SNC – Sistema Nervoso Central

SO – Sulfito Oxidase

SOD – Superóxido Dismutase

## 1. Introdução

### 1.1. Catabolismo de Aminoácidos Sulfurados

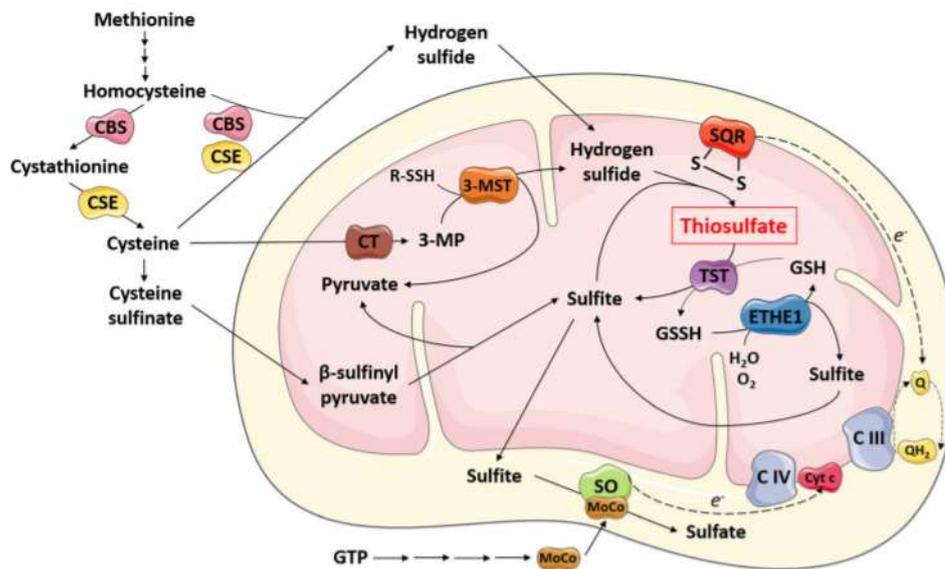
O enxofre pertence ao mesmo grupo do oxigênio na tabela periódica, mas é muito menos eletronegativo, sendo esta diferença responsável por algumas das propriedades distintas dos aminoácidos contendo enxofre. Neste contexto, a metionina e a cisteína são consideradas os principais aminoácidos sulfurados, pois eles são 2 dos 20 aminoácidos canônicos que são incorporados nas proteínas (BROSNAN; BROSNAN, 2006).

A metionina está dentre os aminoácidos mais hidrofóbicos devido à substituição do oxigênio pelo enxofre. Essa propriedade faz com que a maior parte dos resíduos de metionina em proteínas globulares seja encontrada no núcleo hidrofóbico interno. Já em domínios de proteínas integrais, a metionina, na maioria das vezes, interage com a bicamada lipídica. Contudo, em algumas proteínas, uma fração dos resíduos de metionina fica na superfície exposta, sendo mais suscetíveis à oxidação, formando resíduos de sulfóxido de metionina. Alguns autores consideram esses resíduos de metionina em proteínas como antioxidantes endógenos (BROSNAN; BROSNAN, 2006; LEVINE; MOSONI; BERLETT; STADTMAN, 1996).

Já a cisteína é um aminoácido polar e que desempenha uma função importante na estrutura da proteína em virtude de sua capacidade de formar ligações dissulfeto inter e intra-cadeia. Devido a essa capacidade de resíduos de cisteína (dois resíduos) formarem ligações dissulfeto, esse aminoácido age de maneira essencial na estrutura e no dobramento de proteínas. Além disso, tais proteínas contendo ligações dissulfeto são geralmente destinadas à exportação ou fazem parte de membranas plasmáticas.

A metionina e cisteína são catabolizadas por uma via contendo as enzimas cistationina  $\beta$ -sintase e  $\gamma$ -cistationase, as quais produzem sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ).

Este gás é então metabolizado na mitocôndria através de uma via contendo as enzimas enxofre dioxigenase (ETHE1), sulfeto quinona oxidorreductase, tiosulfato enxofre transferase e sulfeto oxidase (SO) (Figura 1). A via inicia com a oxidação do sulfeto de hidrogênio pela sulfeto quinona oxidorreductase, formando tiosulfato. O enxofre do tiosulfato pode então ser transferido para uma molécula de glutatona pela enzima tiosulfato enxofre transferase, formando um persulfato. O persulfato pode ser transferido para a ETHE1, a qual oxida esse composto a sulfeto. O sulfeto pode finalmente ser oxidado a sulfato pela SO ou ser convertido a tiosulfato pela ação da sulfeto quinona oxidorreductase (Figura 1). Diferentes mutações já foram relatadas no gene da ETHE1, causando a doença chamada de encefalopatia etilmalônica (TIRANTI; BRIEM; LAMANTEA; MINERI *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Rota catabólica dos aminoácidos metionina e cisteína. Adaptado de Grings et al. 2018.

## **1.2 Encefalopatia Etilmalônica (EE)**

A EE, também conhecida como deficiência da ETHE1, é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene que codifica a ETHE1. A ETHE1 é uma enxofre dioxigenase de 30 kDa localizada na matriz mitocondrial que, como descrito anteriormente, está envolvida no metabolismo de aminoácidos sulfurados. É uma doença que foi primeiramente reportada em famílias Italianas, porém afeta predominantemente crianças da região Arabia e do Mediterrâneo (TIRANTI; BRIEM; LAMANTEA; MINERI *et al.*, 2006). A maioria dos pacientes acometidos por esta doença começam a apresentar os sintomas a partir dos 6 (seis) primeiros meses de vida, onde a maioria destes pacientes morrem até 2 (dois) anos de vida (PIGEON; CAMPEAU; CYR; LEMIEUX *et al.*, 2009). A prevalência dessa doença ainda é desconhecida, porém sabe-se que até hoje foram já descritos mais de 80 indivíduos confirmados pelo diagnóstico molecular acometidos pela deficiência da ETHE1. Acredita-se que a taxa de ocorrência dessa doença é baixa devido ao difícil diagnóstico e também por apresentar morte prematura dos pacientes (DI MEO; LAMPERTI; TIRANTI, 1993).

### **1.2.1. Achados Bioquímicos e Diagnóstico**

A EE é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo de metabólitos potencialmente tóxicos em tecidos e líquidos biológicos dos pacientes. Dentre os principais metabólitos acumulados estão o sulfeto de hidrogênio e o tiosulfato. Os níveis de tiosulfato descritos na literatura podem comumente chegar a 200 $\mu$ M no plasma de pacientes (indivíduos normais: < 5 $\mu$ M) (KABIL; BANERJEE, 2010; TIRANTI; VISCOMI; HILDEBRANDT; DI MEO *et al.*, 2009; VISCOMI; BURLINA; DWEIKAT; SAVOJARDO *et al.*, 2010). Além disso, altas concentrações de sulfeto de

hidrogênio inibem a enzima desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta, o que acarreta acúmulo do ácido etilmalônico (EMA) nos pacientes.

O perfil bioquímico da doença ainda inclui elevados níveis de lactato, acilcarnitinas, acilglicinas e ácido metilsuccínico (MSA). Estudos mostraram que os níveis de EMA na urina de pacientes variam de 60 a 930 mmol/mol de creatinina (níveis normais: < 17), ao passo que os níveis de MSA um isômero do EMA, são de 2 a 200 mmol/mol de creatinina (níveis normais: < 12) (BOYER; SOWA; DI MEO; EFTEKHARIAN *et al.*, 2018; NENAD BLAU, 2014; NOWACZYK; LEHOTAY; PLATT; FISHER *et al.*, 1998). É importante ressaltar que os pacientes comumente sofrem de crises agudas desencadeadas por infecções ou períodos de vacinação, aumentando ainda mais os níveis dos metabólitos no organismo, podendo causar um dano ainda maior aos pacientes deficientes da ETHE1.

### **1.2.2. Sintomatologia e Achados Neuropatológicos**

Os pacientes acometidos pela EE apresentam sintomatologia variada, podendo demonstrar já nos primeiros dias de vida disfunção neurológica, alterações vasculares crônicas e problemas gastrointestinais que, na maioria das vezes, levam o paciente à morte. Os sintomas neurológicos incluem atraso no desenvolvimento psicomotor, hipotonia, convulsões tônico-clônicas e tetraparesia espástica. Dentre os achados neuropatológicos, pode-se citar atrofia e ataxia cerebelar, atrofia frontotemporal cortical, e anormalidades nos gânglios basais, áreas da substância branca e tronco cerebral (BRISMAR; OZAND, 1994; GROSSO; MOSTARDINI; FARNETANI; MOLINELLI *et al.*, 2002; NOWACZYK; BLASER; CLARKE, 1998; OZAND; RASHED; MILLINGTON; SAKATI *et al.*, 1994; SAHEBEKHTIARI; NIELSEN; JOHANNSEN; PALMFELDT, 2016; TIRANTI; BRIEM; LAMANTEA; MINERI *et al.*,

2006; TIRANTI; VISCOMI; HILDEBRANDT; DI MEO *et al.*, 2009; WAJNER, 2019). É importante salientar aqui que, dentre as diferentes regiões cerebrais, a expressão proteica da enzima ETHE1 é elevada no córtex cerebral, hipocampo, gânglios basais e cerebelo (proteinatlas.org) sugerindo que essas estruturas cerebrais são mais vulneráveis aos efeitos tóxicos dos metabólitos acumulados na EE.

### **1.2.3. Tratamento**

O tratamento disponível para os pacientes acometidos pela EE é baseado em fármacos antiespásticos, relaxantes musculares e antiepilépticos. A melhor resposta tem sido observada com uma terapia baseada no uso combinado de N-acetilcisteína (NAC) e metronidazol, pois promove a eliminação do sulfeto de hidrogênio e diminui a produção deste metabólito por bactérias anaeróbicas, respectivamente (WAJNER, 2019). Essa terapia foi levemente modificada por Boyer *et al.* (2018) com a implementação de uma dieta restrita em aminoácidos contendo enxofre além do uso de NAC e metronidazol, mostrando melhora nos sinais clínicos e marcadores bioquímicos, entretanto apenas um pequeno número de pacientes recebeu esse tratamento até o momento (BOYER; SOWA; DI MEO; EFTEKHARIAN *et al.*, 2018). Outros estudos também mostraram que o transplante de fígado é uma importante alternativa em casos graves (TAM; ALDHAHERI; MYSORE; TESSIER *et al.*, 2019; WAJNER, 2019). Contudo, deve ser salientado aqui que ainda não existe um tratamento totalmente eficaz para os pacientes.

### **1.2.4. Fisiopatologia**

Os mecanismos patológicos responsáveis pelos sintomas e danos cerebrais vistos na EE ainda não estão bem estabelecidos, porém é sugerido que o acúmulo

de metabólitos tóxicos está envolvido na disfunção bioenergética e desregulação da sinalização redox das células, levando conseqüentemente à morte celular (TIRANTI; VISCOMI; HILDEBRANDT; DI MEO *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que o sulfeto de hidrogênio inibe fortemente a citocromo *c* oxidase (COX) e a anidrase carbônica em diferentes tipos celulares (DI MEO; FAGIOLARI; PRELLE; VISCOMI *et al.*, 2011). Também foi observado que este mesmo composto inibe a respiração mitocondrial em neurônios corticais derivados de hiPSC, aumenta a produção de radicais hidroxil e F<sub>2</sub>-isoprostanos em coração e cérebro de ratos, e induz apoptose em culturas neuronais (GIORDANO; VISCOMI; ORLANDI; PAPOFF *et al.*, 2012; JIANG; CHAN; ALI; SAHA *et al.*, 2016; VISCOMI; BURLINA; DWEIKAT; SAVOJARDO *et al.*, 2010). Outros estudos evidenciaram que o sulfeto de hidrogênio inibe a atividade da creatina cinase (CK) e induz a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) em cérebro e culturas de hepatócitos preparadas de ratos (CARDOSO; PLETSCH; PARMEGGIANI; GRINGS *et al.*, 2017; DE MOURA ALVORCEM; BRITTO; PARMEGGIANI; GLANZEL *et al.*, 2018; THOMPSON; VALENTINE; VALENTINE, 2003).

Como mencionado anteriormente, outro metabólito acumulado nesta doença é o EMA. Diferentes trabalhos mostram que este ácido inibe a atividade da CK e induz a abertura do PTPM em cérebro de ratos (AMARAL; CECATTO; BUSANELLO; RIBEIRO *et al.*, 2012; CECATTO; AMARAL; LEIPNITZ; CASTILHO *et al.*, 2014; LEIPNITZ; SCHUCK; RIBEIRO; DALCIN *et al.*, 2003; SCHUCK; LEIPNITZ; RIBEIRO; DALCIN *et al.*, 2002). Foi visto ainda que este ácido diminui a atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, induz dano oxidativo e diminui as defesas antioxidantes em córtex cerebral e estriado de ratos (RITTER; KLEEMANN; HICKMANN; AMARAL *et al.*, 2015; SCHUCK; BUSANELLO; MOURA; TONIN *et al.*, 2010; SCHUCK; MILANEZ;

FELISBERTO; GALANT *et al.*, 2015). O EMA também inibe o transporte de malato e succinato (AMARAL; CECATTO; BUSANELLO; RIBEIRO *et al.*, 2012), o que corrobora achados mostrando que pacientes exibem elevados níveis de ácido láctico, pois a energia necessária para a produção de ATP pela cadeia respiratória estará comprometida, fazendo com que a célula tenha preferência para a produção de ATP pela respiração anaeróbica e conseqüentemente produza ácido láctico em excesso (SAHEBEKHTIARI; NIELSEN; JOHANNSEN; PALMFELDT, 2016). Além disso, foi observado que fibroblastos de pacientes portadores da EE e camundongos deficientes para ETHE1 apresentam distúrbios no estado redox, reforçando achados que sugerem o envolvimento de espécies reativas na progressão da doença (PALMFELDT; VANG; STENBROEN; PAVLOU *et al.*, 2011; VISCOMI; BURLINA; DWEIKAT; SAVOJARDO *et al.*, 2010).

### **1.3. Metabolismo Energético Cerebral**

Na maioria das espécies de adultos vertebrados (exceção dos primatas), o sistema nervoso central (SNC) utiliza 2-8% da energia do metabolismo basal total (BORDONE; SALMAN; TITUS; AMINI *et al.*, 2019). O cérebro humano é responsável por 20% do consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>) e 25% da utilização da glicose, embora corresponda a apenas 2% do peso corporal (SOKOLOFF; REIVICH; KENNEDY; DES ROSIERS *et al.*, 1977). Além disso, dentre as células neurais, os neurônios gastam 70-80% da energia total, com a porção restante sendo utilizada pelas células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e microglia) (HARRIS; JOLIVET; ATTWELL, 2012).

O destino do metabolismo da glicose no cérebro depende do tipo celular e das isoformas das enzimas metabólicas expressas por essas células. Por exemplo, os neurônios são predominantemente oxidativos, enquanto astrócitos, em sua maioria,

são glicolíticos (HAMBERGER; HYDEN, 1963; HYDEN; LANGE, 1962). Além da produção de adenosina-5'-trifosfato (ATP), a glicose também é usada pelas células neurais para a síntese de ácidos graxos e outros lipídeos, assim como de mielina, proteínas, neurotransmissores, nucleotídeos, e de glicogênio nos astrócitos (CAMANDOLA; MATTSON, 2017).

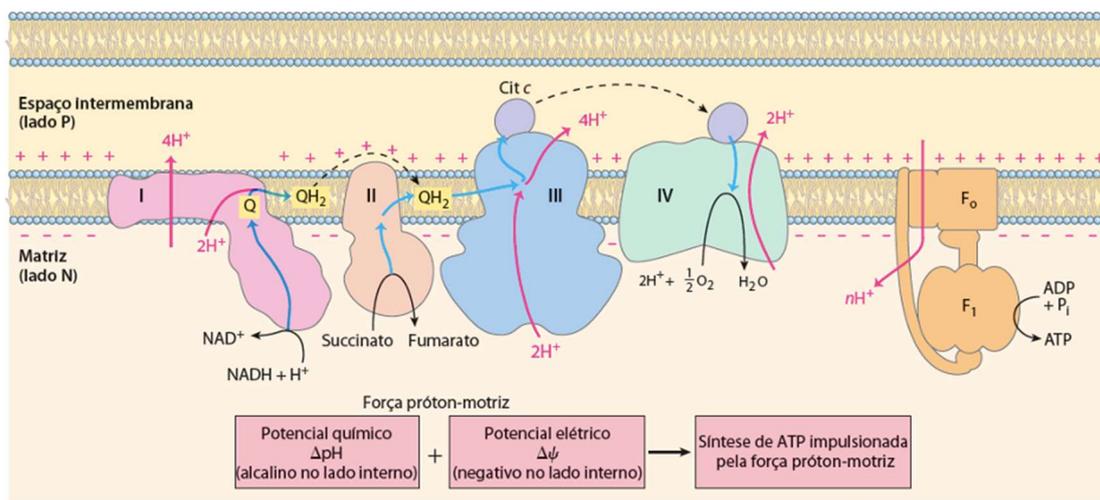
A glicose é oxidada por meio da glicólise, da via das pentoses fosfatos, do ciclo do ácido cítrico (CAC), e pela fosforilação oxidativa nas células neurais (CAMANDOLA; MATTSON, 2017). Os astrócitos possuem alta taxa glicolítica, sendo que grande parte da glicose nessas células é convertida a lactato e direcionada para os neurônios. Nessas células, o lactato é convertido a piruvato e subsequentemente oxidado através do CAC e da cadeia transportadora de elétrons (CTE), onde ocorre a produção de ATP através da fosforilação oxidativa (BELANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011; PELLERIN, 2005).

#### **1.4. Fosforilação Oxidativa**

A fosforilação oxidativa é a fonte primária da produção ATP para trabalho metabólico e mecânico, fornecendo a maior parte da energia usada na biossíntese, para manter adequadamente o equilíbrio de íons e para o trabalho mecânico. Todas as etapas oxidativas na degradação de aminoácidos, carboidratos e gorduras são direcionadas para a etapa final da respiração celular, na qual a energia da oxidação é transformada em ATP pela fosforilação oxidativa (WILSON, 2017).

Os equivalentes reduzidos NADH e FADH<sub>2</sub> são os responsáveis por fornecerem elétrons para a CTE, servindo como substratos para a geração de ATP. Na membrana interna da mitocôndria, uma membrana impermeável a maioria das moléculas e íons (incluindo NADH e FADH<sub>2</sub>), os elétrons provenientes desses

equivalentes são transportados pelos complexos da CTE até o último componente acceptor de elétrons, o  $O_2$ , que conseqüentemente é reduzido a  $H_2O$  e  $CO_2$  pela COX. Neste processo, os elétrons são transferidos devido aos potenciais de redução crescentes dos diferentes componentes da CTE. O fluxo de elétrons cria um gradiente eletroquímico (força próton-motora) através do bombeamento de prótons pelos complexos da CTE para o espaço intermembranas. O retorno dos prótons para a matriz mitocondrial pelo canal  $F_o$  do complexo V permite a fosforilação de ADP a ATP pela porção  $F_1$  desse mesmo complexo (LEIBERMAN MA, 2009; WILSON, 2017) .



**Figura 2.** Representação da transferência de elétrons e bombeamento de prótons pelos complexos da cadeia respiratória mitocondrial com conseqüente síntese de ATP (NELSON, 2018).

### 1.5. $\alpha$ -Cetoglutarato Desidrogenase ( $\alpha$ -KGDH)

Como visto anteriormente, o metabolismo oxidativo, que inclui as enzimas do CAC, é essencial para a síntese de ATP. Uma das etapas chaves que ocorre no CAC é a oxidação do  $\alpha$ -cetoglutarato à succinil-CoA com produção de NADH através do complexo da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase ( $\alpha$ -KGDH). A  $\alpha$ -KGDH é um complexo enzimático constituído de 3 subunidades: E1)  $\alpha$ -Cetoglutarato desidrogenase; E2) Diidrolipoamida succiniltransferase; E3) Diidrolipoamida desidrogenase. Visto que o

$\alpha$ -cetoglutarato é gerado tanto no CAC quanto por transaminação, a reação do complexo da  $\alpha$ -KGDH também conecta o metabolismo de glutamato ao CAC (SANTOS; GIBSON; COOPER; DENTON *et al.*, 2006).

## 1.6. Homeostase Mitocondrial

Além do papel fundamental que exerce no metabolismo energético celular, a mitocôndria também está envolvida nos processos de apoptose, homeostase de íons, imunidade inata, produção de antioxidantes e tamponamento do cálcio (CABRAL-COSTA; KOWALTOWSKI, 2020; SHADEL; HORVATH, 2015).

No que se refere à apoptose, a mitocôndria pode promover a liberação de proteínas pró-apoptóticas, tais como o citocromo *c*, para o citosol celular, desencadeando processos que ativam as enzimas do tipo caspases, responsáveis pela chamada morte celular programada. A liberação para o citosol normalmente ocorre por meio da ativação das proteínas da família da Bcl-2, porém existem outras maneiras pelas quais este evento pode ocorrer.

O poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) é outro mecanismo pelo qual o citocromo *c* pode ser liberado pela mitocôndria. O PTPM consiste em um evento onde há aumento da permeabilidade mitocondrial resultante da abertura de um canal não-específico na membrana (permeável a substâncias de até 1,5kDa de diâmetro) (HALESTRAP, 2009). A abertura do PTPM pode levar a uma disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, à morte celular, podendo ser programada (apoptose, no caso de liberação do citocromo *c*) ou não-programada (necrose) (GRIMM; BRDICZKA, 2007). É importante salientar aqui que a ativação deste complexo proteico é uma das principais causas de morte celular em diferentes condições fisiopatológicas, incluindo isquemia/reperfusão, doenças

neurodegenerativas, dano cerebral traumático, distrofia muscular e toxicidade por drogas (FIGUEIRA; BARROS; CAMARGO; CASTILHO *et al.*, 2013).

A abertura do PTPM traz consequências irreversíveis para a mitocôndria e para a homeostase celular. A principal consequência é a dissipação do potencial de membrana mitocondrial, pois a membrana mitocondrial interna não é mais capaz de manter o gradiente eletroquímico. Além disso, todas as moléculas de baixo peso molecular entram em equilíbrio através da membrana interna da mitocôndria, incluindo cofatores e íons. Esses eventos fazem então com que a mitocôndria libere citocromo *c*, como descrito acima, e outras proteínas pró-apoptóticas (HALESTRAP, 2009). O influxo elevado de  $\text{Ca}^{+2}$  para a mitocôndria é um dos mais importantes fatores que causam a abertura do PTPM. O aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  afeta o estado redox mitocondrial e, através do aumento de ERO, pode induzir a formação de ligações cruzadas de tiois em proteínas da membrana mitocondrial, causando a abertura do PTPM. Outros fatores importantes que podem facilitar ou causar a abertura do PTPM incluem estresse oxidativo, depleção de nucleotídeos adenina, elevadas concentrações de fosfato e despolarização mitocondrial (HALESTRAP, 2009).

### **1.7. Radicais Livres e Espécies Reativas**

Radicaais livres são átomos, metais de transição ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital externo (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL B, 2015). Esse(s) elétron(s) confere(m) uma alta reatividade ao radical, pois ele pode perder ou receber um segundo elétron proveniente de outra molécula com objetivo de se tornar mais estável (HALLIWELL, 2006). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico há a formação de radicais livres, além das chamadas espécies reativas. Na mitocôndria, o  $\text{O}_2$  sofre redução por quatro elétrons, resultando

na formação de água (H<sub>2</sub>O). No entanto, estima-se que aproximadamente 1% ou menos do oxigênio utilizado na CTE não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido aos radicais livres ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e radical hidroxil (OH<sup>•</sup>), e também à espécie reativa peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), processo este que pode ser exacerbado em condições patológicas (BOVERIS; CHANCE, 1973; SIES, 2015).

O termo genérico “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O<sub>2</sub> como, por exemplo, os radicais superóxido e hidroxila, mas também algumas substâncias reativas não-radicaais, como o peróxido de hidrogênio (HALLIWELL B, 2015). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) e o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) os principais representantes. As ERO e ERN apresentam uma série de funções, tais como sinalização celular e síntese e regulação de proteínas (IRANI, 2000; WALL; OH; DIERS; LANDAR, 2012), além de atuarem como defesas do organismo contra infecções, como no caso da liberação de espécies reativas tóxicas pelos neutrófilos (ARATANI; MIURA; OHNO; SUZUKI, 2012; DELANTY; DICHTER, 1998). Entretanto, quando formadas em excesso, essas espécies são capazes de causar danos celulares através da oxidação de diversas biomoléculas (HALLIWELL B, 2015).

### **1.8. Defesas Antioxidantes**

As células apresentam mecanismos eficientes responsáveis por evitar os efeitos danosos causados pelo excesso de espécies reativas e radicais livres: as defesas antioxidantes enzimáticas e antioxidantes não-enzimáticos endógenos ou derivados da dieta. Embora diferindo na sua composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo (HALLIWELL B, 2015).

- Defesas antioxidantes enzimáticas: essas defesas incluem as enzimas

superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx), que atuam diretamente sobre as ERO; e as enzimas glutathione redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que têm papel fundamental na reciclagem de glutathione reduzida-GSH e NADPH, respectivamente, moléculas importantes para as defesas antioxidantes.

- Defesas não-enzimáticas incluem moléculas que neutralizam espécies reativas por interação direta, sem a necessidade de atividade enzimática, tais como a GSH, a melatonina e as vitaminas  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico, ou ainda moléculas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, como a transferrina que liga íons ferro.

## **1.9. Estresse Oxidativo**

O nosso sistema antioxidante é capaz de neutralizar as espécies reativas produzidas fisiologicamente. Entretanto, em determinadas condições patológicas, há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua remoção pelos mecanismos de defesa antioxidante, o que dá origem a uma situação denominada estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL B, 2015). Dessa forma, quando a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis no sistema, ocorre “estresse oxidativo”. Este fenômeno pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição que aceleram a produção de algumas espécies reativas, ou então da combinação de quaisquer desses fatores (HALLIWELL, 2006).

Se o desequilíbrio for grave, essas espécies reativas oxidarão componentes

importantes para a homeostase celular, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. O dano causado por essas espécies pode ser muito prejudicial e até mesmo levar à morte celular.

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular:

- Adaptação: as células podem tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em aumento da síntese de defesas antioxidantes a fim de restaurar o balanço pró-oxidante / antioxidante.
- Dano celular: o estresse oxidativo pode provocar dano a alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios). Nesses casos, a resposta ao dano tecidual pode ser reversível; a célula entra em um estado de homeostase alterado temporário ou prolongado, que não causa morte celular.
- Morte celular: pode ocorrer principalmente por necrose ou apoptose. Na morte por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. A liberação de antioxidantes, como a CAT e a GSH, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo heme, agentes que podem afetar as células adjacentes. Já no caso de apoptose, um mecanismo intrínseco de morte programada é ativado e não há a liberação do conteúdo celular (HALLIWELL B, 2015).

## **2.1 Justificativa e Objetivos**

### **2.1.1 Justificativa e objetivo geral**

Apesar de os pacientes acometidos pela EE apresentarem sintomas neurológicos graves e anormalidades cerebrais, incluindo no cerebelo, e terem uma baixa expectativa de vida, os mecanismos neurotóxicos responsáveis pelo dano tecidual nos pacientes ainda não estão bem esclarecidos. Devido a isso, o objetivo

desta tese foi avaliar os efeitos *in vitro* do sulfeto de hidrogênio e EMA sobre a homeostase redox e a bioenergética mitocondrial em cerebelo de ratos jovens. Os efeitos *in vivo* do EMA sobre a homeostase redox em cerebelo também foram investigados. Com os resultados obtidos desta tese espera-se que seja possível a elucidação de diferentes mecanismos responsáveis pela fisiopatologia da EE, visando o entendimento de como o cerebelo é lesionado, e ainda contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, conseqüentemente melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

## **2.1.2 Objetivos Específicos**

### **Capítulo I**

No capítulo I foram avaliados os efeitos *in vitro* do sulfeto de hidrogênio na ausência e presença de inibidores do PTPM, e de compostos antioxidantes e redutores em cerebelo de ratos sobre:

- a) A bioenergética mitocondrial: respiração mitocondrial, potencial de membrana ( $\psi_m$ ), inchamento mitocondrial, capacidade de retenção de cálcio e atividade da CK.
- b) O dano neuronal: redução de MTT (viabilidade celular), avaliação da atividade extracelular da lactado desidrogenase (LDH) e o ensaio de captação de vermelho neutro.

### **Capítulo II**

Neste capítulo foram investigados os efeitos do EMA e MSA na ausência e presença de inibidores do PTPM em cerebelo de ratos jovens sobre:

- a) A bioenergética mitocondrial: respiração mitocondrial, conteúdo de ATP mitocondrial, efluxo mitocondrial de  $\alpha$ -cetoglutarato, atividades das enzimas do

CAC, atividade da GDH, atividades dos complexos da cadeia respiratória e atividade da CK, potencial de membrana ( $\psi_m$ ), conteúdo mitocondrial de NADPH.

- b) Inchamento e capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{+2}$  mitocondrial.
- c) Homeostase redox: níveis de GSH e de malondialdeído (MDA), produção de superóxido e atividades de enzimas antioxidantes.

Neste capítulo, também foi feita uma análise estrutural e molecular *in silico* das possíveis interações do EMA com a  $\alpha$ -KGDH e transportadores mitocondriais.

## **PARTE II**

### ***Artigos Científicos***

# Capítulo I

## **Evidence that thiol group modification and reactive oxygen species are involved in hydrogen sulfide-induced mitochondrial permeability transition pore opening in rat cerebellum**

Leonardo de Moura Alvorcem, Renata Britto, Belisa Parmeggiani, Nicolás Manzke Glanzel, Nevtton Teixeira da Rosa-Junior, Cristiane Cecatto, Larissa Daniele Bobermin, Alexandre Umpierrez Amaral, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz.

Artigo científico publicado no periódico *Mitochondrion*, 47:141-150, 2019.

## **Capítulo II**

### **Ethylmalonic acid impairs bioenergetics by disturbing succinate and glutamate oxidation and induces mitochondrial permeability transition pore opening in rat cerebellum**

Leonardo de Moura Alvorcem, Renata Britto, Cristiane Cecatto, Ana Cristina Roginski, Franciele Rohden, Juliete Nathali Scholl, Fátima C. R. Guma, Fabrício Figueiró, Alexandre Umpierrez Amaral, Geancarlo Zanatta, Bianca Seminotti, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz.

Artigo científico aceito no periódico *Journal of Neurochemistry* em 04/2020.

## **PARTE III**

### ***Discussão e Conclusões***

### 3. Discussão

Indivíduos afetados pela EE apresentam sintomas neurológicos progressivos e danos cerebrais graves logo nos primeiros dias ou meses de vida. Os sintomas neurológicos incluem atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual e convulsões tônico-clônicas generalizadas. Além disso, os pacientes geralmente apresentam hipotonia logo após o nascimento que pode evoluir para uma hipertonia, e dano microvascular generalizado que leva à diarreia hemorrágica crônica. Cabe também ressaltar que a deterioração neurológica progride após infecções devido a crises encefalopáticas agudas (DI MEO; LAMPERTI; TIRANTI, 1993; GRINGS; WAJNER; LEIPNITZ, 2020). Os exames neuropatológicos revelam anormalidades nos gânglios da base e cerebelo, bem como na substância branca periventricular e cerebelar, podendo evoluir para uma leucoencefalopatia difusa (GRINGS; WAJNER; LEIPNITZ, 2020; ZAFEIRIOU; AUGOUSTIDES-SAVVOPOULOU; HAAS; SMET *et al.*, 2007).

No que se refere especificamente ao dano cerebelar observado na EE, é importante considerar que essa estrutura é uma das principais responsáveis pelo controle de nossos movimentos, e que lesões nesse tecido podem causar ataxia ou descoordenação, hipotonia e tremores (D'ANGELO, 2018). A síndrome chamada de ataxia cognitiva ocorre em várias patologias cerebelares em associação com a ataxia motora. Neste contexto, já foi relatado que pacientes com autismo, esquizofrenia, depressão e dislexia apresentam dano no cerebelo (D'ANGELO, 2010; D'ANGELO; CASALI, 2012). Também se sabe que estudos de imagem, comportamentais e de modelos animais pré-clínicos apontam claramente para o desenvolvimento cerebelar e o desenvolvimento da conectividade cerebelo-cortical como fatores que determinam o início e a gravidade das doenças psiquiátricas infantis (SATHYANESAN; ZHOU;

SCAFIDI; HECK *et al.*, 2019). Dessa forma, considerando esses achados e que os pacientes acometidos pela EE apresentam danos cerebelares, este estudo teve como principal alvo de estudo o cerebelo.

A EE é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo de compostos sulfurados potencialmente tóxicos, como o sulfeto de hidrogênio, nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes. Além desses compostos, ocorre acúmulo do EMA e do MSA, este último sendo encontrado em menores quantidades (DIONISI-VICI; DIODATO; TORRE; PICCA *et al.*, 2016; GRINGS; WAJNER; LEIPNITZ, 2020; VISCOMI; BURLINA; DWEIKAT; SAVOJARDO *et al.*, 2010). Apesar de altas concentrações de sulfeto de hidrogênio serem encontradas nos pacientes, este metabólito não pode ser medido com confiabilidade por ser um gás que tem alta reatividade. Em função disso, o diagnóstico dos pacientes é realizado sobretudo através da medida do tiosulfato no plasma e do EMA na urina dos pacientes. Também é importante ser considerado aqui que acidemia láctica é comumente observada, principalmente durante as crises encefalopáticas, indicando uma disfunção mitocondrial (DI MEO; LAMPERTI; TIRANTI, 1993; GRINGS; WAJNER; LEIPNITZ, 2020; TIRANTI; VISCOMI; HILDEBRANDT; DI MEO *et al.*, 2009)

Dessa forma, no primeiro capítulo desta tese avaliamos inicialmente os efeitos *in vitro* do sulfeto de hidrogênio em culturas de neurônios preparadas de cerebelo de ratos. Estudos anteriores mostram que o acúmulo de sulfeto de hidrogênio inibe *in vitro* e *in vivo* a atividade da COX em cérebro, músculos esqueléticos, fígado, rins, coração e intestino de roedores (DI MEO; FAGIOLARI; PRELLE; VISCOMI *et al.*, 2011; JIANG; CHAN; ALI; SAHA *et al.*, 2016; TIRANTI; VISCOMI; HILDEBRANDT; DI MEO *et al.*, 2009). Neste trabalho, utilizamos diferentes concentrações do sulfeto

de hidrogênio na faixa de micromolar (10 - 300 $\mu$ M), pois o tiosulfato, um composto com maior estabilidade derivado do sulfeto atinge concentrações nessa faixa ou até mais elevadas em urina e sangue de pacientes (DI MEO; LAMPERTI; TIRANTI, 1993; VISCOMI; BURLINA; DWEIKAT; SAVOJARDO *et al.*, 2010).

Observamos que o sulfeto dissipou o potencial de membrana mitocondrial em neurônios cultivados de cerebelo, indicando disfunção bioenergética. Este resultado já era esperado, pois, como citado acima, o sulfeto é um potente inibidor da COX (DI MEO; FAGIOLARI; PRELLE; VISCOMI *et al.*, 2011). O sulfeto também diminuiu a viabilidade desses neurônios, verificada pelo aumento da atividade da LDH extracelular, bem como pela diminuição da redução do MTT e do acúmulo de vermelho neutro. A liberação da LDH para o meio extracelular (meio de cultura) é um indicador de que está ocorrendo dano na membrana celular e possivelmente morte celular (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). A redução de MTT é um método baseado na conversão do MTT a formazan por ação de desidrogenases mitocondriais (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Assim, o produto formazan, que é impermeável às membranas celulares, se acumula em células saudáveis. Já a captação de vermelho neutro ocorre por lisossomos de células saudáveis; dessa forma, a redução desse composto na presença de alguma substância citotóxica diminui seu acúmulo pelos lisossomos por um provável dano celular (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). É relevante comentar aqui que o sulfeto de hidrogênio (1-1000  $\mu$ M) não alterou a viabilidade em culturas primárias de astrócitos de córtex cerebral de ratos (CARDOSO; PLETSCHE; PARMEGGIANI; GRINGS *et al.*, 2017). Apesar de as culturas de neurônios usadas em nosso estudo terem sido preparadas de cerebelo, enquanto os astrócitos foram

cultivados de córtex cerebral, pode ser especulado que os neurônios são sensíveis à ação tóxica do sulfeto de hidrogênio.

Outros achados relevantes de nosso estudo são de que as alterações sobre o potencial de membrana e a redução de MTT em neurônios foram prevenidas pela adição de CsA, um inibidor da ciclofilina D, a qual já foi demonstrada fazer parte do PTPM (HALESTRAP, 2009; HALESTRAP; BRENNER, 2003). A melatonina (MEL), um antioxidante, também preveniu essas alterações causadas pelo sulfeto. Esses resultados indicam que o sulfeto de hidrogênio induz a abertura do PTPM mediada pela geração de ERO, possivelmente causando morte neuronal.

No próximo passo de nossa investigação, estudamos de forma mais detalhada os mecanismos pelos quais o sulfeto de hidrogênio causa prejuízos à bioenergética e abertura do PTPM usando homogeneizado e mitocôndrias isoladas (frações mitocondriais) de cerebelo. O sulfeto diminuiu a respiração mitocondrial (respiração estimulada por ADP e transferência de elétrons através da cadeia respiratória) usando substratos que levam à produção tanto de NADH (piruvato, malato e glutamato) quanto de FADH<sub>2</sub> (succinato) em cerebelo. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores de nosso grupo que relataram uma diminuição da respiração mitocondrial em córtex cerebral de ratos (CARDOSO; PLETSCH; PARMEGGIANI; GRINGS *et al.*, 2017), bem como diminuição dos níveis de ATP e redução da respiração mitocondrial em fibroblastos de pacientes acometidos pela EE (GRINGS; SEMINOTTI; KARUNANIDHI; GHALOUL-GONZALEZ *et al.*, 2019).

Também observamos que o sulfeto diminuiu a capacidade de retenção de Ca<sup>2+</sup>, induziu o inchamento mitocondrial e dissipou o potencial de membrana em mitocôndrias isoladas de cerebelo. Similarmente aos achados em neurônios

cerebelares, esses efeitos foram prevenidos quando utilizamos CsA mais ADP e também vermelho de rutênio, um inibidor do transportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{+2}$ , indicando abertura do PTPM pelo sulfeto. A abertura do poro leva ao influxo de água e de outras substâncias para matriz mitocondrial, causando inchamento mitocondrial, perda do potencial de membrana mitocondrial, desregulação da fosforilação oxidativa e liberação de fatores pró-apoptóticos, levando por fim à morte celular (HALESTRAP, 2009). Todos esses efeitos tóxicos gerados pelo sulfeto de hidrogênio ocorreram na presença de concentrações subtóxicas de  $\text{Ca}^{+2}$ , indicando que um efeito sinérgico do sulfeto com esse íon para induzir a abertura do PTMP.

A seguir, avaliamos a ação de diferentes compostos, incluindo antioxidantes, agentes redutores e alquilantes, sobre os parâmetros que indicam a abertura do PTPM pelo sulfeto. Notamos que, similarmente aos resultados obtidos em culturas neuronais, a MEL preveniu a dissipação do potencial de membrana, além de ter prevenido o inchamento mitocondrial e o decréscimo na capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{+2}$ . Esses resultados reforçam nossa hipótese de que pelo menos parte do dano envolvido na abertura do PTPM pode estar sendo gerado pelo ataque de ROS, pois a MEL é um potente sequestrador de radicais livres, com atividade significativa até mesmo sobre radicais hidroxila, o radical mais tóxico já descrito (WASEEM; TABASSUM; PARVEZ, 2016). Além disso, é importante considerar aqui que estudos mostram que a MEL interage com a membrana interna mitocondrial, aumentando sua fluidez, o que leva a um aumento na eficiência na transferência de elétrons da cadeia respiratória (GARCIA; LOPEZ-PINGARRON; ALMEIDA-SOUZA; TRES *et al.*, 2014; REYES-TOSO; REBAGLIATI; RICCI; LINARES *et al.*, 2006). Outro composto que preveniu os efeitos induzidos pelo sulfeto de hidrogênio foi a N-etilmaleimida (NEM).

Este composto é um agente alquilante lipofílico capaz de penetrar na membrana e que possui afinidade por grupamentos tiois de proteínas. Neste particular, já foi evidenciado que esse composto faz ligações cruzadas com grupamentos tiois em proteínas do poro, levando a uma estabilização de sua estrutura (KOROTKOV; KONOVALOVA; BRAILOVSKAYA; SARIS, 2016). Visto que a NEM preveniu a abertura do PTPM pelo sulfeto, podemos sugerir que um ataque de espécies reativas a grupamentos tiois de proteínas do poro seja o mecanismo responsável pela abertura do poro. Pesquisadores já evidenciaram que o ataque de substâncias reativas a grupamentos tiois de proteínas essenciais que incorporam o PTPM induz a sua abertura (GRECO; SHAFER; FISKUM, 2011; KIM; YUN; KIM, 2003). Também já foi encontrado na literatura que compostos com propriedades antioxidantes que possuem afinidade por grupamentos tiois de proteínas também inibem a abertura do PTPM e conseqüentemente não induzem morte celular (OHTANI; KATOH; TANAKA; SAOTOME *et al.*, 2012; PUNTEL; ROOS; FOLMER; NOGUEIRA *et al.*, 2010). Entretanto, ainda são necessários mais estudos sobre os mecanismos de abertura do PTPM, para tentar compreender quais proteínas específicas estão envolvidas nessas reações de oxidação induzidas pelo sulfeto de hidrogênio.

O tiosulfato, um composto que é formado pela fixação de sulfeto a sulfito pela enzima sulfeto quinona oxidoreductase, também é encontrado em altos níveis nos pacientes com EE. Considerando isso e que pesquisadores demonstraram que o tiosulfato causa efeitos tóxicos através da inibição da atividade da CK em estriado de ratos (DE MOURA ALVORCEM; DA ROSA; GLANZEL; PARMEGGIANI *et al.*, 2017; GRINGS; PARMEGGIANI; MOURA; DE MOURA ALVORCEM *et al.*, 2018), resolvemos analisar seu efeito sobre a bioenergética mitocondrial. Observamos que

este metabólito não alterou nenhum dos parâmetros analisados, sugerindo que a dano cerebelar encontrado na EE é causado, em grande parte, pelo sulfeto de hidrogênio. No entanto, são necessários mais estudos com concentrações diferentes de tiosulfato e outros modelos animais e celulares para avaliar se esse composto realmente não causa toxicidade nessa estrutura cerebral. Neste contexto, um trabalho de nosso grupo mostrou que a administração de tiosulfato em estriado de ratos causou efeitos tóxicos moderados apenas sobre as atividades da citrato sintase e CAT, reforçando a visão de que esse metabólito parece não induzir toxicidade significativa (GRINGS; PARMEGGIANI; MOURA; DE MOURA ALVORCEM *et al.*, 2018).

Foi verificado ainda que o sulfeto inibiu a atividade da CK em cerebelo, o que está de acordo com achados prévios mostrando que essa enzima é inibida por este metabólito em córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos (CARDOSO; PLETSCHE; PARMEGGIANI; GRINGS *et al.*, 2017). Já está bem descrito que a CK possui um papel fundamental para a função encefálica através do transporte de ligações fosfato de alta energia dos seus sítios de produção na matriz mitocondrial para seus sítios de consumo no citosol, mantendo os níveis de ATP estáveis na célula (DU; COOPER; LUKAS; COHEN *et al.*, 2013; WENDT; SCHLATTNER; WALLIMANN, 2003). Também já se sabe que a CK possui resíduos de aminoácidos bastante vulneráveis à oxidação, como a cisteína 282 do seu sítio ativo, e que a atividade da CK cerebral diminui após a exposição a moléculas que induzem a produção de espécies reativas (LI; SUN; PARK; JEONG *et al.*, 2011; WANG; SAMUDIO; SAFE, 2001; WENDT; SCHLATTNER; WALLIMANN, 2003). Além disso, observamos que a GSH e a MEL preveniram a diminuição da atividade da CK causada pelo sulfeto, sugerindo que esse

efeito é devido à oxidação de grupos tiois críticos da enzima por espécies reativas, tais como radicais hidroxila, que são majoritariamente sequestrados pela MEL (REITER; TAN; MANCHESTER; QI, 2001; TAMURA; TAKASAKI; TAKETANI; TANABE *et al.*, 2013). Esses achados também condizem com os resultados demonstrando que o sulfeto induz a abertura do PTPM por oxidação de grupamentos tiois de proteínas do poro.

A EE é uma acidúria orgânica bioquimicamente caracterizada também pelo acúmulo de ácidos dicarboxílicos como EMA e MSA. O MSA é um isômero do EMA e é excretado na urina dos pacientes em menores quantidades que o EMA (TIRANTI; BRIEM; LAMANTEA; MINERI *et al.*, 2006). Trabalhos já mostraram que o EMA prejudica a homeostase energética (AMARAL; CECATTO; BUSANELLO; RIBEIRO *et al.*, 2012; RITTER; KLEEMANN; HICKMANN; AMARAL *et al.*, 2015) e causa aumento da produção de ROS, além de induzir dano oxidativo lipídico e proteico em córtex cerebral de ratos (SCHUCK; BUSANELLO; MOURA; TONIN *et al.*, 2010; SCHUCK; MILANEZ; FELISBERTO; GALANT *et al.*, 2015). Assim, no segundo capítulo focamos na avaliação dos efeitos do EMA sobre parâmetros de bioenergética mitocondrial, e homeostase redox e do  $Ca^{+2}$  em cerebelo de ratos. As concentrações do EMA utilizadas em nosso estudo foram similares às encontradas para ácidos orgânicos acumulados em outras acidemias orgânicas (SAUER; OKUN; FRICKER; MAHRINGER *et al.*, 2006), visto que ainda não há relatos na literatura descrevendo os níveis do EMA no cérebro de pacientes acometidos pela EE.

O EMA reduziu o consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 e na respiração desacoplada suplementada por succinato, glutamato e malato, bem como diminuiu os níveis de ATP. Cabe destacar aqui que concentrações relativamente baixas de EMA (0,5 e 1 mM) também alteraram a respiração mitocondrial. Como já destacado

anteriormente, esses resultados estão de acordo com dados recentes mostraram que a respiração mitocondrial e os níveis de ATP também estão reduzidos em fibroblastos de pacientes acometidos pela EE (GRINGS; SEMINOTTI; KARUNANIDHI; GHALOUL-GONZALEZ *et al.*, 2019).

A fim de estudar quais mecanismos são responsáveis por essas alterações na respiração mitocondrial, determinamos os efeitos do EMA sobre as atividades das enzimas do CAC, da GDH e dos complexos da CTE. Surpreendentemente, o EMA não alterou as atividades da GDH, MDH, SDH e do complexo II da CTE, mas diminuiu as atividades da ACO e da  $\alpha$ -KGDH. A inibição da ACO está de acordo com trabalhos da literatura que evidenciaram que essa enzima é altamente sensível à oxidação por espécies reativas (GARDNER; NGUYEN; WHITE, 1994; GARDNER; RAINERI; EPSTEIN; WHITE, 1995; SCHUCK; BUSANELLO; MOURA; TONIN *et al.*, 2010; SCHUCK; MILANEZ; FELISBERTO; GALANT *et al.*, 2015). A ACO é uma enzima que contém ferro e enxofre em sua estrutura realizando a conversão de citrato a isocitrato. Mais especificamente, a ACO possui um sítio catalítico contendo  $([4\text{Fe-4S}]^{+2})$  essencial para a sua atividade; contudo, um dos ferros encontrados no sítio é bastante lábil e portanto altamente vulnerável a ataques de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Neste particular, estudos já mostraram que o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{ONOO}^-$  inativam a ACO mitocondrial através de modificações no grupamento  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$  (CASTRO; RODRIGUEZ; RADI, 1994; HAN; CANALI; GARCIA; AGUILERA *et al.*, 2005; NULTON-PERSSON; SZWEDA, 2001).

No que concerne à diminuição da atividade da  $\alpha$ -KGDH, foi visto que o EMA inibe esta enzima de maneira mista. Nesse tipo de inibição, o inibidor pode se ligar tanto na enzima livre quanto no complexo substrato-enzima. A  $\alpha$ -KGDH é uma desidrogenase do CAC fundamental para o metabolismo de glutamato, pois oxida  $\alpha$ -

cetogluturato, o qual pode ser produzido pela transaminação do glutamato, gerando NADH (TRETTER; ADAM-VIZI, 2005). O EMA ainda aumentou o efluxo de  $\alpha$ -cetogluturato possivelmente por consequência da elevação nas concentrações de  $\alpha$ -cetogluturato devido à inibição da  $\alpha$ -KGDH. Neste contexto, um estudo verificou que a inibição da  $\alpha$ -KGDH em neurônios cerebelares gerou um aumento na formação de  $\alpha$ -cetogluturato (SANTOS; GIBSON; COOPER; DENTON *et al.*, 2006). Por outro lado, em caso de acúmulo de  $\alpha$ -cetogluturato em consequência da inibição da  $\alpha$ -KGDH pelo EMA, não pode ser descartado que pelo menos parte desse substrato energético acumulado seja reconvertido a glutamato, o qual pode ser direcionado para o *GABA shunt* (“desvio do GABA”). Neste caso, o *GABA shunt* levaria à síntese de succinato com o objetivo de desviar o bloqueio do CAC causado pela inibição da  $\alpha$ -KGDH (SANTOS; GIBSON; COOPER; DENTON *et al.*, 2006; SHI; RISA; SONNEWALD; GIBSON, 2009)

Ainda realizamos análises *in silico* dos possíveis efeitos do EMA sobre a  $\alpha$ -KGDH. A  $\alpha$ -KGDH é um complexo multienzimático formado por três subunidades que possui um mecanismo cíclico de recuperação interna intrínseca que permite a conversão contínua de  $\alpha$ -cetogluturato em succinil-CoA, estando todas as etapas sob a influência do equilíbrio químico e modulações alostéricas. Esse complexo proteico é formado pelas subunidades da oxogluturato desidrogenase (E1), diidrolipoamida succinil transferase (E2) e diidrolipoamida desidrogenase (E3). As subunidades E1 e E2 são especificamente do complexo da  $\alpha$ -KGDH, porém a subunidade E3 participa também do complexo da piruvato desidrogenase, sendo esta subunidade a responsável pela formação de NADH. Nossas simulações demonstraram que o EMA, apesar de ter a capacidade de se ligar na subunidade E1, a ligação seria no sítio do cofator tiamina difosfato, sugerindo que é pouco provável que o EMA iniba a  $\alpha$ -KGDH

de forma competitiva. Entretanto, observamos que o EMA tem maior capacidade de se ligar em sítios catalíticos na subunidade E3, ainda que com menor energia que as coenzimas FAD e NAD<sup>+</sup>. Também foi analisado a interação do EMA em outros locais da subunidade E3, na presença de FAD e NAD<sup>+</sup>, e observamos que o EMA pode se ligar no sítio do ácido lipoico (próximo ao canal H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O) com valor de energia muito próximo ao ácido lipoico, indicando uma possível competição com este cofator. Além disso, foram feitas análises para avaliar a interação do EMA tanto com o transportador de glutamato quanto com o de  $\alpha$ -cetogluturato e foi visto que o EMA tem a capacidade de se ligar nesses transportadores. Tais resultados sugerem que o EMA é capaz de inibir diretamente o transportador de glutamato e também de estimular diretamente o efluxo de  $\alpha$ -cetogluturato da mitocôndria. Esses achados aliados a resultados prévios mostrando que o ácido metilmalônico, um análogo estrutural do EMA, entra na mitocôndria através do transportador de  $\alpha$ -cetogluturato (MELO; MIRANDOLA; ASSUNCAO; CASTILHO, 2012) sugerem que o EMA pode utilizar esse transportador para entrar na organela, causando o seu acúmulo. É importante salientarmos a importância desses transportadores para o organismo. Os carreadores (transportadores) mitocondriais (MC) constituem uma família de proteínas também chamada de família de carreadores de soluto 25 (SLC25). Essa família é constituída por diferentes tipos de proteínas, incluindo as responsáveis pelo transporte dos substratos através da membrana mitocondrial interna, isto é, entre o citosol/espço intermembranas e a matriz mitocondrial. Assim, os MCs são responsáveis por funções importantes no metabolismo energético, como o fornecimento de cofatores para enzimas e precursores para a replicação e transcrição mitocondrial. Neste particular, existem alguns erros inatos do metabolismo que afetam esses transportadores (PALMIERI; SCARCIA; MONNE, 2020), causando uma redução nas sua atividade ou

até mesmo a degradação do transportador mal dobrado, ocorrendo assim acúmulo de metabólitos. Em comum com outras doenças mitocondriais, muitas das patologias associadas aos MC manifestam-se com miopatia, encefalopatia e neuropatia (PALMIERI; SCARCIA; MONNE, 2020).

A seguir, resolvemos investigar também os mecanismos envolvidos na inibição da respiração mitocondrial suplementada por succinato. Depois de observarmos que as atividades do CII da CTE e da SDH permaneceram inalteradas na presença do EMA, realizamos um experimento para avaliar a respiração mitocondrial em mitocôndrias intactas e permeabilizadas. Esse experimento teve o intuito de analisar um possível efeito do EMA sobre o transporte mitocondrial de succinato, como visto anteriormente em outro estudo de nosso grupo (AMARAL; CECATTO; BUSANELLO; RIBEIRO *et al.*, 2012). Vimos que a inibição da respiração pelo EMA foi atenuado em mitocôndrias permeabilizadas, confirmando a nossa hipótese em cerebelo. Também reforçando esses resultados, foi demonstrado que a adição de succinato exógeno preveniu o efeito do EMA. Visto que um dos principais transportadores de succinato e malato é o transportador de dicarboxilatos, foram realizadas simulações *in silico* para estudar a interação do EMA com esse transportador. O EMA compartilha sítios de interação em comum com os substratos energéticos nesse transportador, sugerindo uma competição pelo transporte através da membrana. Aqui é relevante mencionar novamente que o EMA inibiu a respiração mitocondrial suplementada também por malato, e que este é considerado o principal substrato endógeno para o transportador de dicarboxilatos (FIERMONTE; PALMIERI; DOLCE; LASORSA *et al.*, 1998; SCHOOLWERTH; LANOUE, 1985). Portanto, uma competição do EMA com succinato e malato pelo transporte mitocondrial pode causar a falta desses importantes substratos anapleróticos para o CAC.

Disfunções na bioenergética mitocondrial estão associadas com a produção de ERO e que o EMA leva à abertura do poro de transição mitocondrial em cérebro de ratos (CECATTO; AMARAL; LEIPNITZ; CASTILHO *et al.*, 2014), neste capítulo também avaliamos a influência do EMA sobre a abertura do PTPM em cerebelo, utilizando succinato ou glutamato como substrato. O EMA diminuiu a capacidade de retenção de cálcio e o conteúdo de NADPH, dissipou o potencial de membrana, além de ter induzido inchamento mitocondrial na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  exógeno e de ambos os substratos energéticos. Contudo, esses efeitos não foram observados na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainda, vimos que todas essas alterações bioquímicas foram evitadas por CsA mais ADP, bem como pelo RR, indicando que o EMA induz abertura do PTPM em cerebelo. Dessa maneira, esses resultados sugerem que a abertura do PTPM nessa região cerebral ocorre a partir de um sinergismo entre  $\text{Ca}^{2+}$  e a inibição metabólica provocada pelo EMA.

Como um dano na bioenergética está fortemente correlacionado com o aumento de ERO e a literatura evidencia que o EMA causa dano oxidativo em córtex cerebral e estriado de ratos (LEIPNITZ; SCHUCK; RIBEIRO; DALCIN *et al.*, 2003; RITTER; KLEEMANN; HICKMANN; AMARAL *et al.*, 2015; SCHUCK; BUSANELLO; MOURA; TONIN *et al.*, 2010; SCHUCK; LEIPNITZ; RIBEIRO; DALCIN *et al.*, 2002), determinamos os efeitos *in vitro* e *in vivo* do EMA sobre a homeostase redox em cerebelo. Nossos resultados *in vitro* mostraram que o EMA, na concentração de 5 mM, causou peroxidação lipídica, diminuiu a concentração de GSH e também diminuiu a atividade da enzima ACO, a qual, como mencionado anteriormente, é uma enzima vulnerável à ataque oxidativo (Grings *et al.*, 2013). Uma vez que apenas concentrações altas de EMA (5 mM) induziram estresse oxidativo *in vitro*, também avaliamos esse mecanismo em experimentos *in vivo*. Os achados *in vivo* mostraram

que a injeção intracerebelar de EMA em altas doses (2 e 3  $\mu\text{mol}$ ) diminuiu a concentração de GSH e aumentou a atividade das enzimas G6PDH e GST. Além disso, a injeção de EMA aumentou os níveis de superóxido mitocondrial, visto a partir da marcação realizada com o MitoSOX Red. Ao analisar esses resultados em conjunto, percebemos que o EMA causou mudanças na homeostase redox apenas em altas concentrações. Sendo assim, especulamos que o EMA pode provocar estresse oxidativo em cerebelo durante episódios agudos de descompensação metabólica, já que durante essas crises os compostos acumulados na doença, incluindo o EMA, estão aumentados de forma acentuada. No entanto, mais estudos conduzidos em outros modelos experimentais (culturas de células, por exemplo) são necessários a fim de confirmar se o EMA causa estresse oxidativo apenas em altas concentrações. Por outro lado, apesar de os mecanismos envolvidos na indução de estresse oxidativo pelo EMA não terem sido determinados aqui, sugerimos que inibição dos complexos da cadeia respiratória, como já observado para o EMA em outros trabalhos (RITTER; KLEEMANN; HICKMANN; AMARAL *et al.*, 2015), ou da  $\alpha$ -KGDH (TRETTER; ADAM-VIZI, 2005) pode ser a fonte de geração de ERO a partir do ácido orgânico.

Como pode ser observado ainda no Anexo I desta tese, foram feitos experimentos para avaliar os efeitos *in vitro* do MSA sobre a bioenergética e homeostase redox mitocondrial em cerebelo de ratos. É importante ressaltar aqui que já foi relatado que os níveis do MSA na urina de pacientes acometidos pela EE estão em concentrações bem menores que as do EMA (em torno de dez vezes menor) (BURLINA; ZACCHELLO; DIONISI-VICI; BERTINI *et al.*, 1991; TIRANTI; VISCOMI; HILDEBRANDT; DI MEO *et al.*, 2009; TIRANTI; ZEVIANI, 2013) e, por este motivo, testamos os efeitos de MSA na concentração de 500  $\mu\text{M}$ . O MSA não alterou a

respiração e o potencial de membrana mitocondrial, e não induziu inchamento dessa organela. Também observamos que este ácido não alterou a atividade do CII da CTE, da SDH, da CK, assim como também não modificou os níveis de GSH. Estes resultados sugerem que possivelmente o MSA não está envolvido na fisiopatologia da EE, porém estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Portanto, foi verificado que o EMA contribui para a fisiopatologia do dano cerebelar verificada na EE, uma vez que este ácido inibe a respiração mitocondrial suplementada por glutamato, succinato e malato, levando a uma redução na produção de ATP pela competição com os substratos energéticos pelos transportadores mitocondriais. Ainda vimos que o EMA inibe a  $\alpha$ -KGDH, resultando em aumento do efluxo de  $\alpha$ -cetogluturato e conseqüentemente induzindo uma troca entre esse substrato e o EMA extramitocondrial. Além disso, nossos resultados mostram que o EMA induz a abertura do PTPM e aumenta a produção de ERO e desregula o sistema antioxidante, resultados que estão de acordo com a literatura (CECATTO; AMARAL; LEIPNITZ; CASTILHO *et al.*, 2014; SCHUCK; BUSANELLO; MOURA; TONIN *et al.*, 2010; SCHUCK; MILANEZ; FELISBERTO; GALANT *et al.*, 2015).

Analisando os dois capítulos da tese, podemos sugerir que a toxicidade dos metabólitos sulfeto de hidrogênio e EMA, acumulados na EE, são componentes chave para o aparecimento e progressão do dano cerebelar visto em pacientes acometidos por essa doença. As concentrações desses metabólitos não foram determinadas no cérebro de indivíduos afetados pela EE e consideramos este fato a principal limitação de nossos estudos. Contudo, foram utilizadas concentrações de sulfeto de hidrogênio similares às encontradas do tiosulfato no plasma e urina de pacientes, uma vez que o tiosulfato é derivado direto do sulfeto, ao passo que as concentrações de EMA

foram similares a de ácidos orgânicos encontradas em cérebro de indivíduos portadores de outras acidemias orgânicas, como a acidemia glutárica tipo I (SAUER; OKUN; FRICKER; MAHRINGER *et al.*, 2006). É importante ainda salientar que as concentrações no plasma e urina variam de paciente para paciente, pois diferentes mutações ocorrem nesses indivíduos. Portanto, é possível que os níveis de sulfeto e EMA tenham correlação com a atividade residual da ETHE1 detectada em cada paciente, mas ainda há controvérsias na literatura sobre isso. Por outro lado, apesar de não termos investigado um possível sinergismo do sulfeto e do EMA, é plausível que esses metabólitos, mesmo quando presentes em menores concentrações do que as utilizadas aqui, apresentem ação sinérgica, induzindo neurotoxicidade e, dessa forma, contribuindo para as anormalidades cerebelares observadas na EE.

### **III.2 Conclusões**

Os resultados da tese indicam que o acúmulo de sulfeto de hidrogênio e EMA é tóxico para indivíduos portadores da EE. Observamos que o sulfeto inibe a respiração mitocondrial, além de diminuir o potencial de membrana e a capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{+2}$ , e induzir abertura do PTPM pela oxidação de grupamentos tiois de proteínas desse poro mediada por ERO em mitocôndrias de cerebelo.

Também vimos que o EMA reduz a respiração mitocondrial devido à inibição da  $\alpha$ -KGDH, aumento do efluxo de  $\alpha$ -cetogluturato e alterações no transporte mitocondrial de substratos energéticos. O EMA ainda causa a abertura do PTPM e, em altas concentrações, induz estresse oxidativo em cerebelo de ratos. Já o MSA, um isômero do EMA, não causa efeitos tóxicos no cerebelo.

### III.3 Perspectivas

Esse trabalho tem como perspectivas:

- Avaliar os efeitos *in vivo* de uma única injeção intracerebroventricular (icv) do sulfeto de hidrogênio e EMA sobre a bioenergética mitocondrial e a homeostase redox em córtex cerebral, estriado e cerebelo de ratos neonatos (1 dia de vida).
- Avaliar os efeitos da injeção icv de sulfeto e EMA sobre o imunoconteúdo proteico de diferentes marcadores de fissão e fusão mitocondrial, assim como marcadores de apoptose em córtex cerebral, estriado e cerebelo de ratos neonatos.
- Estudar os efeitos *in vitro* do sulfeto de hidrogênio, EMA e MSA sobre funções mitocondriais em culturas de neurônios e astrócitos de cérebro de ratos. Os metabólitos serão adicionados nas culturas de forma isolada ou combinada a fim de avaliar possíveis efeitos sinérgicos.

### REFERÊNCIAS

AMARAL, A. U.; CECATTO, C.; BUSANELLO, E. N.; RIBEIRO, C. A. *et al.* Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport. **Mol Genet Metab**, 105, n. 1, p. 84-90, Jan 2012.

ARATANI, Y.; MIURA, N.; OHNO, N.; SUZUKI, K. [Role of neutrophil-derived reactive oxygen species in host defense and inflammation]. **Med Mycol J**, 53, n. 2, p. 123-128, 2012.

BELANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metab**, 14, n. 6, p. 724-738, Dec 7 2011.

BORDONE, M. P.; SALMAN, M. M.; TITUS, H. E.; AMINI, E. *et al.* The energetic brain - A review from students to students. **J Neurochem**, 151, n. 2, p. 139-165, Oct 2019.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, 134, n. 3, p. 707-716, Jul 1973.

BOYER, M.; SOWA, M.; DI MEO, I.; EFTEKHARIAN, S. *et al.* Response to medical and a novel dietary treatment in newborn screen identified patients with ethylmalonic encephalopathy. **Mol Genet Metab**, 124, n. 1, p. 57-63, May 2018.

BRISMAR, J.; OZAND, P. T. CT and MR of the brain in the diagnosis of organic acidemias. Experiences from 107 patients. **Brain Dev**, 16 Suppl, p. 104-124, Nov 1994.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. The sulfur-containing amino acids: an overview. **J Nutr**, 136, n. 6 Suppl, p. 1636S-1640S, Jun 2006.

BURLINA, A.; ZACCHELLO, F.; DIONISI-VICI, C.; BERTINI, E. *et al.* New clinical phenotype of branched-chain acyl-CoA oxidation defect. **Lancet**, 338, n. 8781, p. 1522-1523, Dec 14 1991.

CABRAL-COSTA, J. V.; KOWALTOWSKI, A. J. Neurological disorders and mitochondria. **Mol Aspects Med**, 71, p. 100826, Feb 2020.

CAMANDOLA, S.; MATTSON, M. P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. **EMBO J**, 36, n. 11, p. 1474-1492, Jun 1 2017.

CARDOSO, G. M. F.; PLETSCH, J. T.; PARMEGGIANI, B.; GRINGS, M. *et al.* Bioenergetics dysfunction, mitochondrial permeability transition pore opening and lipid peroxidation induced by hydrogen sulfide as relevant pathomechanisms underlying the neurological dysfunction characteristic of ethylmalonic encephalopathy. **Biochim Biophys Acta**, 1863, n. 9, p. 2192-2201, Sep 2017.

CASTRO, L.; RODRIGUEZ, M.; RADI, R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. **J Biol Chem**, 269, n. 47, p. 29409-29415, Nov 25 1994.

CECATTO, C.; AMARAL, A. U.; LEIPNITZ, G.; CASTILHO, R. F. *et al.* Ethylmalonic acid induces permeability transition in isolated brain mitochondria. **Neurotox Res**, 26, n. 2, p. 168-178, Aug 2014.

D'ANGELO, E. Neuronal circuit function and dysfunction in the cerebellum: from neurons to integrated control. **Funct Neurol**, 25, n. 3, p. 125-127, Jul-Sep 2010.

D'ANGELO, E. Physiology of the cerebellum. **Handb Clin Neurol**, 154, p. 85-108, 2018.

D'ANGELO, E.; CASALI, S. Seeking a unified framework for cerebellar function and dysfunction: from circuit operations to cognition. **Front Neural Circuits**, 6, p. 116, 2012.

DE MOURA ALVORCEM, L.; BRITTO, R.; PARMEGGIANI, B.; GLANZEL, N. M. *et al.* Evidence that thiol group modification and reactive oxygen species are involved in hydrogen sulfide-induced mitochondrial permeability transition pore opening in rat cerebellum. **Mitochondrion**, Nov 3 2018.

DE MOURA ALVORCEM, L.; DA ROSA, M. S.; GLANZEL, N. M.; PARMEGGIANI, B. *et al.* Disruption of Energy Transfer and Redox Status by Sulfite in Hippocampus, Striatum, and

Cerebellum of Developing Rats. **Neurotox Res**, 32, n. 2, p. 264-275, Aug 2017.

DELANTY, N.; DICHTER, M. A. Oxidative injury in the nervous system. **Acta Neurol Scand**, 98, n. 3, p. 145-153, Sep 1998.

DI MEO, I.; FAGIOLARI, G.; PRELLE, A.; VISCOMI, C. *et al.* Chronic exposure to sulfide causes accelerated degradation of cytochrome c oxidase in ethylmalonic encephalopathy. **Antioxid Redox Signal**, 15, n. 2, p. 353-362, Jul 15 2011. Research Support, Non-U.S. Gov't.

DI MEO, I.; LAMPERTI, C.; TIRANTI, V. Ethylmalonic Encephalopathy. *In*: ADAM, M. P.; ARDINGER, H. H., *et al* (Ed.). **GeneReviews(R)**. Seattle (WA), 1993.

DIONISI-VICI, C.; DIODATO, D.; TORRE, G.; PICCA, S. *et al.* Liver transplant in ethylmalonic encephalopathy: a new treatment for an otherwise fatal disease. **Brain**, 139, n. Pt 4, p. 1045-1051, Apr 2016.

DU, F.; COOPER, A.; LUKAS, S. E.; COHEN, B. M. *et al.* Creatine kinase and ATP synthase reaction rates in human frontal lobe measured by <sup>31</sup>P magnetization transfer spectroscopy at 4T. **Magn Reson Imaging**, 31, n. 1, p. 102-108, Jan 2013.

FIERMONTE, G.; PALMIERI, L.; DOLCE, V.; LASORSA, F. M. *et al.* The sequence, bacterial expression, and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and *Caenorhabditis elegans*. **J Biol Chem**, 273, n. 38, p. 24754-24759, Sep 18 1998.

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. A.; CASTILHO, R. F. *et al.* Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxid Redox Signal**, 18, n. 16, p. 2029-2074, Jun 1 2013.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**, 160, n. 2, p. 171-177, Jan 5 2006.

GARCIA, J. J.; LOPEZ-PINGARRON, L.; ALMEIDA-SOUZA, P.; TRES, A. *et al.* Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. **J Pineal Res**, 56, n. 3, p. 225-237, Apr 2014.

GARDNER, P. R.; NGUYEN, D. D.; WHITE, C. W. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 91, n. 25, p. 12248-12252, Dec 06 1994. Research Support, Non-U.S. Gov't  
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

GARDNER, P. R.; RAINERI, I.; EPSTEIN, L. B.; WHITE, C. W. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. **J Biol Chem**, 270, n. 22, p. 13399-13405, Jun 2 1995.

GIORDANO, C.; VISCOMI, C.; ORLANDI, M.; PAPOFF, P. *et al.* Morphologic evidence of diffuse vascular damage in human and in the experimental model of ethylmalonic encephalopathy. **J Inherit Metab Dis**, 35, n. 3, p. 451-458, May 2012. Case Reports  
Research Support, Non-U.S. Gov't.

GRECO, T.; SHAFER, J.; FISKUM, G. Sulforaphane inhibits mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, 51, n. 12, p. 2164-2171, Dec 15 2011.

GRIMM, S.; BRDICZKA, D. The permeability transition pore in cell death. **Apoptosis**, 12, n. 5, p. 841-855, May 2007.

GRINGS, M.; PARMEGGIANI, B.; MOURA, A. P.; DE MOURA ALVORCEM, L. *et al.* Evidence that Thiosulfate Inhibits Creatine Kinase Activity in Rat Striatum via Thiol Group Oxidation. **Neurotox Res**, 34, n. 3, p. 693-705, Oct 2018.

GRINGS, M.; SEMINOTTI, B.; KARUNANIDHI, A.; GHALOUL-GONZALEZ, L. *et al.* ETHE1 and MOCS1 deficiencies: Disruption of mitochondrial bioenergetics, dynamics, redox homeostasis and endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in patient fibroblasts. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 12651, Sep 2 2019.

GRINGS, M.; WAJNER, M.; LEIPNITZ, G. Mitochondrial Dysfunction and Redox Homeostasis Impairment as Pathomechanisms of Brain Damage in Ethylmalonic Encephalopathy: Insights from Animal and Human Studies. **Cell Mol Neurobiol**, Oct 9 2020.

GROSSO, S.; MOSTARDINI, R.; FARNETANI, M. A.; MOLINELLI, M. *et al.* Ethylmalonic encephalopathy: further clinical and neuroradiological characterization. **J Neurol**, 249, n. 10, p. 1446-1450, Oct 2002.

HALESTRAP, A. P. What is the mitochondrial permeability transition pore? **J Mol Cell Cardiol**, 46, n. 6, p. 821-831, Jun 2009.

HALESTRAP, A. P.; BRENNER, C. The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. **Curr Med Chem**, 10, n. 16, p. 1507-1525, Aug 2003.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, 141, n. 2, p. 312-322, Jun 2006.

HALLIWELL B, G. J. Radicals in Biology and Medicine. *In*: PRESS, O. U. (Ed.). Oxford, 2015.

HAMBERGER, A.; HYDEN, H. Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. **J Cell Biol**, 16, p. 521-525, Mar 1963.

HAN, D.; CANALI, R.; GARCIA, J.; AGUILERA, R. *et al.* Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione. **Biochemistry**, 44, n. 36, p. 11986-11996, Sep 13 2005.

HARRIS, J. J.; JOLIVET, R.; ATTWELL, D. Synaptic energy use and supply. **Neuron**, 75, n. 5, p. 762-777, Sep 6 2012.

HYDEN, H.; LANGE, P. W. A kinetic study of the neuroglia relationship. **J Cell Biol**, 13, p. 233-237, May 1962.

IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles

of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. **Circ Res**, 87, n. 3, p. 179-183, Aug 4 2000.

JIANG, J.; CHAN, A.; ALI, S.; SAHA, A. *et al.* Hydrogen Sulfide--Mechanisms of Toxicity and Development of an Antidote. **Sci Rep**, 6, p. 20831, Feb 15 2016. Research Support, N.I.H., Extramural  
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.

KABIL, O.; BANERJEE, R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. **J Biol Chem**, 285, n. 29, p. 21903-21907, Jul 16 2010. Research Support, N.I.H., Extramural.

KIM, T. S.; YUN, B. Y.; KIM, I. Y. Induction of the mitochondrial permeability transition by selenium compounds mediated by oxidation of the protein thiol groups and generation of the superoxide. **Biochem Pharmacol**, 66, n. 12, p. 2301-2311, Dec 15 2003.

KOROTKOV, S. M.; KONOVALOVA, S. A.; BRAILOVSKAYA, I. V.; SARIS, N. E. To involvement the conformation of the adenine nucleotide translocase in opening the Tl(+)-induced permeability transition pore in Ca(2+)-loaded rat liver mitochondria. **Toxicol In Vitro**, 32, p. 320-332, Apr 2016.

LEIBERMAN MA, M. A. **Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach**. 2009.

LEIPNITZ, G.; SCHUCK, P. F.; RIBEIRO, C. A.; DALCIN, K. B. *et al.* Ethylmalonic acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebral cortex of young rats in vitro. **Neurochem Res**, 28, n. 5, p. 771-777, May 2003.

LEVINE, R. L.; MOSONI, L.; BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, n. 26, p. 15036-15040, Dec 24 1996.

LI, C.; SUN, S.; PARK, D.; JEONG, H. O. *et al.* Hydrogen peroxide targets the cysteine at the active site and irreversibly inactivates creatine kinase. **Int J Biol Macromol**, 49, n. 5, p. 910-916, Dec 01 2011.

MELO, D. R.; MIRANDOLA, S. R.; ASSUNCAO, N. A.; CASTILHO, R. F. Methylmalonate impairs mitochondrial respiration supported by NADH-linked substrates: involvement of mitochondrial glutamate metabolism. **J Neurosci Res**, 90, n. 6, p. 1190-1199, Jun 2012.

NELSON, M. M. C. a. D. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Tradução TERMIGNONI, C. D. a. C. Artmed Editora, 2018 2018. 1312 p.

NENAD BLAU, M. D., K Michael Gibson, Carlo Dionisi Vici. **Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases**. 2014. 978-3-642-40337-8.

NOWACZYK, M. J.; BLASER, S. I.; CLARKE, J. T. Central nervous system malformations in ethylmalonic encephalopathy. **Am J Med Genet**, 75, n. 3, p. 292-296, Jan 23 1998. Case Reports.

NOWACZYK, M. J.; LEHOTAY, D. C.; PLATT, B. A.; FISHER, L. *et al.* Ethylmalonic and methylsuccinic aciduria in ethylmalonic encephalopathy arise from abnormal isoleucine

metabolism. **Metabolism**, 47, n. 7, p. 836-839, Jul 1998.

NULTON-PERSSON, A. C.; SZWEDA, L. I. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. **J Biol Chem**, 276, n. 26, p. 23357-23361, Jun 29 2001.

OHTANI, H.; KATOH, H.; TANAKA, T.; SAOTOME, M. *et al.* Effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition pore and thiol-mediated responses in cardiac myocytes. **Nitric Oxide**, 26, n. 2, p. 95-101, Feb 15 2012.

OZAND, P. T.; RASHED, M.; MILLINGTON, D. S.; SAKATI, N. *et al.* Ethylmalonic aciduria: an organic acidemia with CNS involvement and vasculopathy. **Brain Dev**, 16 Suppl, p. 12-22, Nov 1994. Case Reports  
Research Support, Non-U.S. Gov't.

PALMFELDT, J.; VANG, S.; STENBROEN, V.; PAVLOU, E. *et al.* Proteomics reveals that redox regulation is disrupted in patients with ethylmalonic encephalopathy. **J Proteome Res**, 10, n. 5, p. 2389-2396, May 6 2011.

PALMIERI, F.; SCARCIA, P.; MONNE, M. Diseases Caused by Mutations in Mitochondrial Carrier Genes SLC25: A Review. **Biomolecules**, 10, n. 4, Apr 23 2020.

PELLERIN, L. How astrocytes feed hungry neurons. **Mol Neurobiol**, 32, n. 1, p. 59-72, Aug 2005.

PIGEON, N.; CAMPEAU, P. M.; CYR, D.; LEMIEUX, B. *et al.* Clinical heterogeneity in ethylmalonic encephalopathy. **J Child Neurol**, 24, n. 8, p. 991-996, Aug 2009.

PUNTEL, R. L.; ROOS, D. H.; FOLMER, V.; NOGUEIRA, C. W. *et al.* Mitochondrial dysfunction induced by different organochalcogens is mediated by thiol oxidation and is not dependent of the classical mitochondrial permeability transition pore opening. **Toxicol Sci**, 117, n. 1, p. 133-143, Sep 2010.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; QI, W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. **Cell Biochem Biophys**, 34, n. 2, p. 237-256, 2001.

REYES-TOSO, C. F.; REBAGLIATI, I. R.; RICCI, C. R.; LINARES, L. M. *et al.* Effect of melatonin treatment on oxygen consumption by rat liver mitochondria. **Amino Acids**, 31, n. 3, p. 299-302, Oct 2006.

RITTER, L.; KLEEMANN, D.; HICKMANN, F. H.; AMARAL, A. U. *et al.* Disturbance of energy and redox homeostasis and reduction of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity provoked by in vivo intracerebral administration of ethylmalonic acid to young rats. **Biochim Biophys Acta**, 1852, n. 5, p. 759-767, May 2015. Research Support, Non-U.S. Gov't.

SAHEBEKHTIARI, N.; NIELSEN, C. B.; JOHANNSEN, M.; PALMFELDT, J. Untargeted Metabolomics Analysis Reveals a Link between ETHE1-Mediated Disruptive Redox State and Altered Metabolic Regulation. **J Proteome Res**, 15, n. 5, p. 1630-1638, May 6 2016.

SANTOS, S. S.; GIBSON, G. E.; COOPER, A. J.; DENTON, T. T. *et al.* Inhibitors of the alpha-

ketoglutarate dehydrogenase complex alter [1-13C]glucose and [U-13C]glutamate metabolism in cerebellar granule neurons. **J Neurosci Res**, 83, n. 3, p. 450-458, Feb 15 2006.

SATHYANESAN, A.; ZHOU, J.; SCAFIDI, J.; HECK, D. H. *et al.* Emerging connections between cerebellar development, behaviour and complex brain disorders. **Nat Rev Neurosci**, 20, n. 5, p. 298-313, May 2019.

SAUER, S. W.; OKUN, J. G.; FRICKER, G.; MAHRINGER, A. *et al.* Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. **J Neurochem**, 97, n. 3, p. 899-910, May 2006.

SCHOOLWERTH, A. C.; LANOUE, K. F. Transport of metabolic substrates in renal mitochondria. **Annu Rev Physiol**, 47, p. 143-171, 1985.

SCHUCK, P. F.; BUSANELLO, E. N.; MOURA, A. P.; TONIN, A. M. *et al.* Promotion of lipid and protein oxidative damage in rat brain by ethylmalonic acid. **Neurochem Res**, 35, n. 2, p. 298-305, Feb 2010.

SCHUCK, P. F.; LEIPNITZ, G.; RIBEIRO, C. A.; DALCIN, K. B. *et al.* Inhibition of creatine kinase activity in vitro by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. **Neurochem Res**, 27, n. 12, p. 1633-1639, Dec 2002.

SCHUCK, P. F.; MILANEZ, A. P.; FELISBERTO, F.; GALANT, L. S. *et al.* Brain and muscle redox imbalance elicited by acute ethylmalonic acid administration. **PLoS One**, 10, n. 5, p. e0126606, 2015.

SHADEL, G. S.; HORVATH, T. L. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. **Cell**, 163, n. 3, p. 560-569, Oct 22 2015.

SHI, Q.; RISA, O.; SONNEWALD, U.; GIBSON, G. E. Mild reduction in the activity of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex elevates GABA shunt and glycolysis. **J Neurochem**, 109 Suppl 1, p. 214-221, May 2009.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol**, 4, p. 180-183, 2015.

SOKOLOFF, L.; REIVICH, M.; KENNEDY, C.; DES ROSIERS, M. H. *et al.* The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. **J Neurochem**, 28, n. 5, p. 897-916, May 1977.

TAM, A.; ALDHAHERI, N. S.; MYSORE, K.; TESSIER, M. E. *et al.* Improved clinical outcome following liver transplant in patients with ethylmalonic encephalopathy. **Am J Med Genet A**, 179, n. 6, p. 1015-1019, Jun 2019.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M. *et al.* Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. **Endocr J**, 60, n. 1, p. 1-13, 2013.

THOMPSON, R. W.; VALENTINE, H. L.; VALENTINE, W. M. Cytotoxic mechanisms of

hydrosulfide anion and cyanide anion in primary rat hepatocyte cultures. **Toxicology**, 188, n. 2-3, p. 149-159, Jun 30 2003.

TIRANTI, V.; BRIEM, E.; LAMANTEA, E.; MINERI, R. *et al.* ETHE1 mutations are specific to ethylmalonic encephalopathy. **J Med Genet**, 43, n. 4, p. 340-346, Apr 2006.

TIRANTI, V.; VISCOMI, C.; HILDEBRANDT, T.; DI MEO, I. *et al.* Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. **Nat Med**, 15, n. 2, p. 200-205, Feb 2009. Research Support, Non-U.S. Gov't.

TIRANTI, V.; ZEVIANI, M. Altered sulfide (H<sub>2</sub>S) metabolism in ethylmalonic encephalopathy. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 5, n. 1, p. a011437, Jan 01 2013. Review.

TRETTNER, L.; ADAM-VIZI, V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 360, n. 1464, p. 2335-2345, Dec 29 2005.

VISCOMI, C.; BURLINA, A. B.; DWEIKAT, I.; SAVOJARDO, M. *et al.* Combined treatment with oral metronidazole and N-acetylcysteine is effective in ethylmalonic encephalopathy. **Nat Med**, 16, n. 8, p. 869-871, Aug 2010. Case Reports  
Research Support, Non-U.S. Gov't.

WAJNER, M. Neurological manifestations of organic acidurias. **Nat Rev Neurol**, 15, n. 5, p. 253-271, May 2019.

WALL, S. B.; OH, J. Y.; DIERS, A. R.; LANDAR, A. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling. **Front Physiol**, 3, p. 369, 2012.

WANG, F.; SAMUDIO, I.; SAFE, S. Transcriptional activation of rat creatine kinase B by 17beta-estradiol in MCF-7 cells involves an estrogen responsive element and GC-rich sites. **J Cell Biochem**, 84, n. 1, p. 156-172, 2001.

WASEEM, M.; TABASSUM, H.; PARVEZ, S. Melatonin modulates permeability transition pore and 5-hydroxydecanoate induced KATP channel inhibition in isolated brain mitochondria. **Mitochondrion**, 31, p. 1-8, Nov 2016.

WENDT, S.; SCHLATTNER, U.; WALLIMANN, T. Differential effects of peroxynitrite on human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. Inactivation, octamer destabilization, and identification of involved residues. **J Biol Chem**, 278, n. 2, p. 1125-1130, Jan 10 2003.

WILSON, D. F. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. **J Physiol**, 595, n. 23, p. 7023-7038, Dec 1 2017.

ZAFEIRIOU, D. I.; AUGOUSTIDES-SAVVOPOULOU, P.; HAAS, D.; SMET, J. *et al.* Ethylmalonic encephalopathy: clinical and biochemical observations. **Neuropediatrics**, 38, n. 2, p. 78-82, Apr 2007.

## ANEXO I

