

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

Manuela Bianchin Marcuzzo

**O SULFETO DE HIDROGÊNIO ALTERA A HOMEOSTASE REDOX E
ENERGÉTICA E A DINÂMICA MITOCONDRIAL EM ESTRIADO DE RATOS**

Porto Alegre

2024

Manuela Bianchin Marcuzzo

**O SULFETO DE HIDROGÊNIO ALTERA A HOMEOSTASE REDOX E
ENERGÉTICA E A DINÂMICA MITOCONDRIAL EM ESTRIADO DE RATOS**

Dissertação 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 mestre em Bioquímica.

Orientador: **Prof. Dr. Guilhian Leipnitz**

Porto Alegre

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me proporcionar o dom da vida!

Agradeço em especial à minha família, meus pais Pedro e Vera. Obrigada pelo incentivo e apoio de sempre. Agradeço todo o suporte, incentivo, amor e dedicação. Vocês com certeza são minha inspiração e são o motivo para eu seguir batalhando pelo meu sonho. Seu conselho de “ir sempre em frente” nunca saiu da minha mente, mãe. Essa frase, dita por ti em quase todas as nossas despedidas sempre me deu forças e vontade de descobrir novos caminhos. Nossas ligações, de toda semana sempre se encerravam com a expressão “ótima semana, mana” dita pelo pai, o que me motivava e me encorajava cada vez mais, pois era o momento que eu sentia que vocês estavam bem e faziam de tudo para me verem feliz e realizada. Podem ter certeza, estou realizada e buscando novos caminhos e novas oportunidades. Sou grata por tudo, sempre!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, agradeço a formação de qualidade e gratuita.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), por proporcionar apoio financeiro durante este período.

Aos meus amigos e colegas do laboratório 38, Rafael, Angela, Vanessa e Ediana, sou grata por todos momentos de risadas, convívio e trocas de experiência. Obrigada por me ajudarem neste período e pela colaboração de sempre.

Às minhas amigas e colegas de laboratório, Camila, Jaque, Josy e Morgana, agradeço pela oportunidade de poder trabalhar com mulheres pesquisadoras tão dedicadas, autênticas e competentes. Obrigada por estarem comigo do início ao fim e por me ajudarem em todos os momentos. Mas mais do que isso, sou grata pela amizade que criamos, um laço de irmandade que sempre esteve presente para apoiar, opinar e proporcionar alegria. Em especial, agradeço a minha amiga Josyane que esteve comigo em todos os experimentos, nos bons e maus momentos, sempre me ajudando no que fosse preciso.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório 27, Crístopher e Nathália, agradeço a ajuda e o auxílio de sempre.

À minha prima, Letícia, obrigada por ser a irmã que eu não tive e por ser tão presente na minha vida, me cuidando, me aconselhando e sempre torcendo por mim.

À minha amiga e colega de profissão, Gabriela Sangoi, compartilhamos as nossas conquistas.

À minha primeira orientadora e incetivadora de Bioquímica, Virgínia Cielo Rech, à todo o seu grupo de pesquisa, sou grata por todos os ensinamentos repassados na época de iniciação científica.

Ao meu querido orientador Dr. Guilhian Leipnitz, sou extremamente grata pelos conselhos, pelo conhecimento transmitido e por toda experiência compartilhada. Obrigada por não medir esforços para eu ingressar no mestrado, por depositar confiança em meu trabalho, e principalmente obrigada por me cativar a buscar coisas novas. Agradeço também tua compreensão de sempre e tuas sábias palavras em momentos de tensão, tornando tudo mais prático, divertido e possível para a conclusão dos trabalhos.

Sumário	
PARTE I	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
I. INTRODUÇÃO	9
I.1 Erros Inatos do Metabolismo	9
I.2 Proteína da encefalopatia etilmalônica 1 (ETHE1)	11
I.3 Encefalopatia etilmalônica (EE)	12
I.4 Homeostase redox	14
1.4.1 Espécies Reativas e Radicais Livres	14
1.4.2 Defesas antioxidantes.....	15
1.4.3 Estresse oxidativo.....	16
I.5 Metabolismo Energético	17
I.6 Controle de qualidade mitocondrial	18
I.7 Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2)	19
II. JUSTIFICATIVA	21
III. OBJETIVOS	22
III.1 Geral	22
III.2 Específicos	22
IV. METODOLOGIA	23
IV. 1 Reagentes	23
IV. 2 Animais	23
IV. 3 Administração de sulfeto	23
IV. 4 Concentrações glutatona reduzida (GSH)	24
IV. 5 Atividade de enzimas antioxidantes	24
IV. 6 Níveis de malondialdeído (MDA)	25
IV. 7 Atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico	26
IV. 8 Atividades dos complexos da cadeia respiratória	27
IV. 9 Respiração mitocondrial	27
IV. 10 Análises de western blotting	28
IV. 11 Determinação de proteínas	29
IV. 12 Análise estatística	29
V. RESULTADOS	30
VI. DISCUSSÃO	44
VII. CONCLUSÃO	49
VIII. PERSPECTIVAS	50
VIII. REFERÊNCIAS	51

PARTE I

RESUMO

A encefalopatia etilmalônica (EE) é uma doença neurometabólica rara de caráter autossômico recessivo causada pela deficiência na proteína da encefalopatia etilmalônica 1 (ETHE1), a qual participa do catabolismo de aminoácidos sulfurados e, portanto, da detoxificação de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Devido à deficiência da ETHE1, a EE caracteriza-se bioquimicamente pelo acúmulo de metabólitos tóxicos em diferentes tecidos, incluindo o cérebro, como o sulfeto de hidrogênio e tiosulfato. Os pacientes apresentam sintomas neurológicos graves como leucoencefalopatia difusa, lesões na substância cinzenta do cérebro e alterações nos gânglios da base, cuja fisiopatologia não está totalmente estabelecida. Além disso, não existe tratamento eficaz para essa doença. Portanto, para elucidar os mecanismos patológicos da EE, investigamos os efeitos da administração intraestriatal de sulfeto no corpo estriado de ratos jovens. Ratos jovens foram anestesiados e receberam uma única injeção intraestriatal de sulfeto (2 e 4 µmol) com auxílio de estereotáxico e foram eutanasiados 30 min após a administração. O estriado foi então dissecado e usado para a determinação da homeostase redox, bioenergética e dinâmica mitocondrial. Nossos achados mostraram que a administração de 2 µmol de sulfeto diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Já na dose de 4 µmol, o sulfeto diminuiu as atividades da SOD, glutatona S-transferase e glutatona redutase, porém aumentou GPx. Os níveis de malondialdeído e glutatona reduzida não foram alterados pelo sulfeto em nenhuma das doses avaliadas. Em relação à atividade das enzimas do ciclo do ácido cítrico, o sulfeto, na dose de 2 µmol, aumentou a citrato sintase, porém não modificou as atividades da malato desidrogenase, isocitrato desidrogenase e succinato desidrogenase. Na dose de 4 µmol, o sulfeto apenas aumentou a atividade da succinato desidrogenase. Além disso, verificamos que apenas a atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial foi alterada pela dose de 4 µmol de sulfeto. As atividades dos complexos I, II e II-III não foram significativamente alteradas. Também foi observado que o sulfeto, em 4 µmol, diminuiu a respiração mitocondrial na presença de piruvato, malato e glutamato, e succinato como substratos. Finalmente, avaliamos os efeitos do sulfeto sobre os níveis do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e de proteínas que participam da dinâmica mitocondrial (fusão e fissão). Observamos que a dose de 4 µmol de sulfeto diminuiu os níveis de Nrf2 e mitofusina 1, porém aumentou os níveis da proteína de atrofia óptica 1 (OPA1). Os níveis da proteína relacionada à dinamina 1 (DRP1) e do canal de ânion dependente de voltagem 1 (VDAC1) não foram alterados. Nossos dados mostram que o sulfeto causa estresse oxidativo e disfunção bioenergética e altera a dinâmica mitocondrial em estriado de ratos. Portanto, sugerimos que esses mecanismos contribuem, ao menos em parte, para a fisiopatologia do dano nos gânglios basais observado em pacientes com EE.

Palavras-chaves: Encefalopatia etilmalônica, Sulfeto de hidrogênio, Bioenergética, Estresse oxidativo, Estriado.

ABSTRACT

Ethylmalonic encephalopathy (EE) is a rare autosomal recessive neurometabolic disease caused by a deficiency in the ethylmalonic encephalopathy 1 (ETHE1) protein, which participates in the catabolism of sulfur amino acids and, therefore, in the detoxification of hydrogen sulfide (H₂S). Due to the enzymatic deficiency, EE is biochemically characterized by the accumulation of toxic metabolites in different tissues, including the brain, such as hydrogen sulfide and thiosulfate. Patients present with severe neurological symptoms that include diffuse leukoencephalopathy, lesions in the gray matter, and changes in the basal ganglia, the pathophysiology of which has not been fully established. Furthermore, there is no effective treatment for this disease. Therefore, to elucidate the pathological mechanisms of EE, we investigated the effects of intrastriatal administration of sulfide in the striatum of young rats. Young rats were anesthetized and received a single intrastriatal injection of sulfide (2 or 4 μ mol) in a stereotaxic device and were euthanized 30 min after administration. The striatum was then dissected and used to determine redox homeostasis, bioenergetics, and mitochondrial dynamics. Our findings showed that the administration of 2 μ mol of sulfide decreased the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). At a dose of 4 μ mol, sulfide decreased the activities of SOD, glutathione S-transferase and glutathione reductase, but increased of GPx. However, malondialdehyde and reduced glutathione levels were not altered by sulfide at any of the doses evaluated. Regarding the activity of citric acid cycle enzymes, sulfide, at the dose of 2 μ mol, increased citrate synthase, but did not modify the activities of malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase. At the dose of 4 μ mol, sulfide only increased succinate dehydrogenase activity. Furthermore, we found that only the activity of respiratory chain complex IV was altered by the dose of 4 μ mol of sulfide. The activities of complexes I, II, and II-III were not significantly altered. It was also observed that sulfide, at 4 μ mol, decreased mitochondrial respiration in the presence of pyruvate, malate and glutamate, as well as succinate as substrates. Finally, we evaluated the effects of sulfide on the levels of Nrf2 and proteins that participate in mitochondrial dynamics (fusion and fission). We observed that the dose of 4 μ mol of sulfide decreased the levels of Nrf2 and mitofusin 1 but increased the levels of optic atrophy protein 1 (OPA1). Dynamin-related protein 1 (DRP1) and voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) levels were not altered. Our data show that sulfide causes oxidative stress and bioenergetic dysfunction and alters mitochondrial dynamics in rat striatum. Therefore, we suggest that these mechanisms contribute, at least in part, to the pathophysiology of basal ganglia damage observed in patients with EE.

Keywords: Ethylmalonic encephalopathy, Hydrogen Sulfide, Bioenergetics, Oxidative stress, Striatum

LISTA DE ABREVIATURAS

3-MP - 3-mercaptopiruvato
3-MST - 3-mercpto-sulfurtransferase
CBS - cistationina β -sintase
CS - citrato sintase
CSE - cistationina γ -liase
DP - doença de Parkinson
DRP1- proteína 1 relacionada à dinamina
EIM - erros inatos do metabolismo
ERN - espécies reativas de nitrogênio
ERO - espécies reativa de oxigênio
ETHE1 - proteína da encefalopatia etilmalônica 1
G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx - glutaciona peroxidase
GR - glutaciona redutase
GSH - glutaciona
GSSG - persulfeto de glutaciona
GST - glutaciona S-transferase
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
H₂S - sulfeto de hidrogênio
HO-1 - heme oxigenase-1
IDH - isocitrato desidrogenase
MDH - malato desidrogenase
MFN1- mitofusina 1
NO• - óxido nítrico
NQO1 - NADPH quinona desidrogenase
Nrf2-fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
O₂ - oxigênio molecular
O₂^{•-} - ânion superóxido
OH• - radical hidroxila
ONOO⁻ - peroxinitrito
OPA1- proteína atrofia óptica 1
OXPHOS - fosforilação oxidativa

SOD - superóxido dismutase

SQR - quinona oxidoreductase

VDAC - canal de ânion dependente de voltagem

I. INTRODUÇÃO

I.1 Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIMs) são um grupo de doenças genéticas causadas por uma deficiência em uma via metabólica, ocasionando, assim, acúmulo de substratos potencialmente tóxicos e a depleção de produtos essenciais (ZEA VERA; GROPMAN, 2023). Os EIMs englobam tanto deficiência ou atividade aumentada de enzimas ou de transportadores quanto anormalidades em fatores de transcrição (ORTIGOZA-ESCOBAR, 2020).

Em 1909, o médico e químico inglês Sir Archibald Edward Garrod foi o primeiro a citar o termo EIM. Além de ter tido este reconhecimento, Sir Garrod foi também o primeiro a descrever a individualidade química bem como os efeitos da consanguinidade, correlacionando-os com diferentes fenótipos. O médico descreveu um defeito metabólico raro, hereditário e recessivo: a “alcaptonúria”. A deficiência em questão ocorre devido a um defeito na degradação da tirosina, resultando em acúmulo de ácido homogentísico em tecidos e líquidos biológicos dos portadores dessa doença. Enquanto a maioria dos pacientes permanecem assintomáticos, alguns podem apresentar calcificação da válvula cardíaca, cálculos renais e artrite (MAK et al., 2013).

No ano de 1982, Sinclair classificou os EIMs de acordo com o tipo de proteína deficiente e órgãos envolvidos, levando em consideração ainda os aspectos bioquímicos, patológicos e clínicos (SINCLAIR, 1982). A classificação era dada em 4 grupos, sendo eles:

- Distúrbios de transporte: abrangem EIMs que podem ser subdivididos em grupos dos distúrbios orgânicos e inorgânicos e são caracterizados por envolverem proteínas transportadoras de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Um exemplo desses distúrbios é o defeito no transporte do magnésio, que acaba ocasionando uma forma específica de desnutrição.
- Distúrbios de armazenamento, eliminação e secreção: abrangem principalmente proteínas relacionadas ao aparelho de Golgi ou lisossomos, provocando acúmulo de moléculas em tecidos específicos. Glicogenoses e doenças de armazenamento de lipídeos são exemplos desses distúrbios.
- Distúrbios de síntese: esses distúrbios são caracterizados por apresentarem síntese incompleta de algumas moléculas importantes como hormônios, moléculas que

participam de defesas imunológicas, dentre outras. Como consequência disto, há a formação de moléculas incomuns. A hipogamaglobulinemia é um exemplo característico deste grupo.

- Distúrbios do metabolismo intermediário: esta classe de doenças é a de mais difícil diagnóstico, pois envolvem deficiências enzimáticas nas rotas de metabolização de moléculas pequenas como aminoácidos, glicídios e neurotransmissores. A consequência é a interrupção de rotas importantes, como o ciclo da ureia e o ciclo do ácido cítrico, com acúmulo de substrato da enzima deficiente e também falta dos produtos. Estes substratos (metabólitos) são potencialmente tóxicos e podem ocasionar danos teciduais, bem como alterações bioquímicas. Como exemplo, tem-se os distúrbios do metabolismo das purinas e pirimidinas, acidúrias orgânicas e aminoacidopatias.

Durante a segunda metade do século XX, houve importantes avanços na área da bioquímica, patologia e genética, marcando também o início da genética bioquímica. A partir disso, em conjunto com o desenvolvimento científico e a inovação tecnológica alcançados, novos estudos sobre os EIM foram realizados, sendo que atualmente são identificados na literatura mais de 1.000 EIMs (FERREIRA et al., 2019). Ainda, no ramo da medicina, foi atribuído uma redefinição de EIM, considerando-os como qualquer condição que leva à interrupção de uma via metabólica, independentemente de estar associada a anormalidades em exames laboratoriais. De acordo com Ferreira et al. (2019), um EIM pode ser desencadeado não apenas pela deficiência de enzimas primárias, mas também através de deficiências de chaperonas ou deficiências em fatores de transcrição que eventualmente podem induzir anormalidades metabólicas. Quanto à classificação, Ferreira et al. ordenaram inúmeras classes envolvidas no metabolismo, as quais compreendem: transtornos de metabolismo intermediário, distúrbios do metabolismo e transporte lipídico, distúrbios que afetam o metabolismo de macromoléculas e organelas complexas, distúrbios peroxissomais, distúrbios do metabolismo de cofatores e minerais, e distúrbios do metabolismo de neurotransmissores e endócrino.

Em relação às apresentações clínicas, são variadas e na maioria das vezes não são específicas. Isso porque os EIMs podem afetar qualquer tipo de célula ou órgão, podendo também ocorrer em combinações e atingindo qualquer faixa etária desde o período fetal até a fase de idade avançada. A sintomatologia pode surgir a partir do acúmulo do substrato potencialmente tóxico, deficiência do produto, ou ambos. As condições são caracterizadas geralmente por sintomas multissistêmicos, com envolvimento frequente

do sistema nervoso central (EBRAHIMI-FAKHARI; VAN KARNEBEEK; MÜNCHAU, 2019). Além disso, alguns sintomas inespecíficos podem surgir, como desnutrição, dificuldade respiratória, letargia ou convulsões, achados estes que ocasionalmente podem ser confundidos com algumas outras doenças ou disfunções cardiopulmonares, por exemplo. O diagnóstico é em parte baseado na sintomatologia e, por conta disto, se torna difícil, sendo que poucos destes distúrbios são diagnosticados no recém-nascido no período pré-natal. Portanto, o médico necessita estar atento aos sintomas e quando necessário realizar um diagnóstico laboratorial para determinar o grau de comprometimento dos tecidos ou órgãos envolvidos através de exames de rotina, como testes bioquímicos, hematológicos, eletrofisiológicos, radiológicos e histopatológicos (SCRIVER et al., 2001). O diagnóstico diferencial é de extrema importância, visto que os distúrbios podem afetar qualquer órgão, em qualquer idade e em qualquer cenário (FERNANDES, SAUDUBRAY, 2000; SAUDUBRAY, GARCIA-CAZORLA, 2018). Muitos EIMs não possuem um tratamento específico e eficaz, e doenças não tratadas podem ser muito graves, resultando em incapacidades ou até mesmo serem fatais (GALOSI; NARDECCHIA; LEUZZI, 2020).

I.2 Proteína da encefalopatia etilmalônica 1 (ETHE1)

A proteína da encefalopatia etilmalônica 1 (ETHE1) está localizada na matriz mitocondrial e participa da degradação do sulfeto de hidrogênio (sulfeto; H_2S) proveniente do catabolismo do enxofre e do metabolismo de bactérias anaeróbicas da microbiota intestinal. Especificamente, o sulfeto é produzido durante a degradação dos aminoácidos metionina e cisteína, na via de transsulfuração, através das enzimas cistationina β -sintase (CBS), γ -cistationase (CSE) e 3-mercaptopiruvato transferase (3-MP), sendo a seguir, metabolizado na mitocôndria. Na mitocôndria, o sulfeto é oxidado pela enzima quinona oxidoreductase (SQR) e o sulfano sulfurado resultante é conjugado ao sulfito, composto produzido pela decomposição de β -sulfinil piruvato, levando à formação de tiosulfato. O sulfito pode ser regenerado a partir do tiosulfato através da enzima tiosulfato enxofre transferase (TST), originando persulfeto de glutationa (GSSG). Este, por sua vez, é então convertido em glutationa (GSH) e sulfito através da ETHE1. Na sequência, o sulfito pode ser conjugado com o sulfeto para formar tiosulfato ou até mesmo ser oxidado a sulfato através da enzima sulfito oxidase (CAO et al., 2019).

As manifestações clínicas estão associadas a variantes patogênicas no gene *ETHE1*, levando à desregulação do metabolismo do enxofre e ocasionando o acúmulo de alguns metabólitos tóxicos, como o sulfeto, em diferentes tecidos dos pacientes, incluindo cérebro, músculo, fígado e mucosa do cólon (DI MEO et al., 2017). Seus níveis elevados causam a inibição da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia curta (SCAD) (KASHIMA et al., 2023). Como consequência da inibição da SCAD, há também acúmulo de ácido etilmalônico (EMA), um derivado da α -carboxilação de butiril-CoA. O EMA é encontrado em níveis urinários entre 60 a 930 nmol/mol de creatinina nos pacientes sendo que o nível normal é < 17 nmol/mol. Outro metabólito acumulado é o tiosulfato, encontrado em níveis aumentados tanto no sangue quanto na urina. Embora o sulfeto seja o principal composto acumulado, devido à sua baixa estabilidade, a medição deste gás é de difícil realização. Por outro lado, seu subproduto tiosulfato é observado em níveis elevados, podendo atingir de 30 a 170 μ M no plasma (normal: $< 4,0$ μ mol /L) (DI MEO et al., 2017).

Os pacientes apresentam sintomas predominantemente neurológicos na infância, como convulsões tônico-clônicas, danos microvasculares generalizados com déficit psicomotor e neurodegeneração progressiva, que está associada à tetraparesia espástica, hipotonia infantil, distonia, e lesões como púrpura petequiral e acrocianose ortostática (GOVINDARAJ et al., 2020). Além disto, há anormalidades nos sistemas vascular e gastrointestinal, com presença de diarreia hemorrágica crônica. Essas alterações geralmente aparecem nos primeiros meses de vida, sendo que a maioria dos indivíduos afetados não sobrevive mais que dois anos de idade. Exames de ressonância magnética mostram anormalidades nos gânglios basais, lesões cerebrais hemorrágicas, danos na substância branca e alterações periventriculares que podem evoluir para leucoencefalopatia difusa. Além disso, são observados perda neuronal, gliose e aumento da densidade dos vasos sanguíneos (DI MEO et al., 2017; GIORDANO et al., 2012).

Estudos têm sugerido que o acúmulo dos metabólitos potencialmente tóxicos, principalmente o sulfeto, tem importante envolvimento na fisiopatologia do dano neurológico observado na EE. Neste contexto, já foi verificado que o sulfeto inibe a atividade da citocromo *c* oxidase e da SCAD, levando à elevação de malonato de etila, acilcarnitinas C4/C5 e ácido láctico no plasma e tecidos (CARDOSO et al., 2017; DIONISI-VICI et al., 2016). O sulfeto ainda inibe a atividades de enzimas do ciclo de Krebs e da creatina cinase (CK) em córtex cerebral de ratos jovens. Também foi visto que a atividade da CK foi inibida em estriado e hipocampo de ratos (CARDOSO et al., 2017).

Além disto, já foi demonstrado também que o sulfeto induz estresse oxidativo em cérebro de ratos (ALVORCEM et al., 2021; CARDOSO et al., 2017; HILL et al., 1984). É importante destacar ainda que diferentes estudos sugerem que o acúmulo de sulfeto é o principal responsável pelos achados neuropatológicos como a atrofia cortico-fronto-temporal progressiva e anormalidades nos gânglios basais e tronco encefálico, além de lesões cerebrais hemorrágicas e danos à substância branca (ERSOY; TIRANTI; ZEVIANI, 2020; GIORDANO et al., 2012; DI MEO et al., 2015).

Atualmente, as opções terapêuticas para a EE são escassas. O tratamento é baseado no uso combinado de N-acetilcisteína, cuja finalidade é o sequestro de sulfeto no organismo, e de metronidazol, um antibiótico que elimina as bactérias anaeróbicas produtoras de sulfeto. Além disso, relatos demonstram que uma dieta restrita em aminoácidos com enxofre também apresenta efeitos benéficos para alguns pacientes. Contudo, o tratamento sintomático é ainda o mais utilizado, envolvendo agentes antiespásticos, relaxantes musculares e fármacos antiepiléticos, bem como hemodiálise (BARTH et al., 2010).

1.4 Homeostase redox

1.4.1 Espécies Reativas e Radicais Livres

As espécies reativas são moléculas produzidas pelo metabolismo celular, sendo altamente instáveis e reativas por serem constituídas de um ou da associação de átomos. Sua presença é considerada crítica para a manutenção de funções fisiológicas normais através da interação com outras moléculas do corpo. As espécies reativas de oxigênio (ERO), compostos produzidos pela ativação ou redução do oxigênio, são moléculas instáveis capazes de reagir com enzimas, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos. Podem ser geradas em grande quantidade durante o estresse oxidativo, e quando formadas excessivamente são capazes de causar danos através da oxidação, podendo ainda contribuir direta e indiretamente para a regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias e resposta inflamatória (FERRIGNO et al., 2023; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2015). Um dos principais exemplos de ERO é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um oxidante fraco e lipossolúvel e que é precursor de ácido hipocloroso (BOVERIS, 1973).

Além das ERO, existem também as espécies reativas de nitrogênio (ERN), como óxido nítrico ($NO\bullet$) e peroxinitrito ($ONOO^-$), responsáveis por funções na sinalização

celular, síntese e regulação de proteínas, fagocitose, regulação do crescimento celular, imunidade e defesa celular (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2015).

Por outro lado, radicais livres são moléculas instáveis que podem existir de modo independente e possuem um ou mais elétrons desemparelhados no orbital externo. Este elétron desemparelhado confere à molécula uma elevada reatividade. Dessa forma, por conta deste desemparelhamento, essas moléculas possuem a capacidade de capturar elétrons de alguma biomolécula da célula visando o emparelhamento do orbital (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2015). ; WANG; HEKIMI, 2015).

Os radicais livres são produzidos o tempo todo no organismo em condições normais. Nas mitocôndrias, diversas etapas na via de redução do oxigênio podem produzir espécies reativas e radicais livres extremamente reativos que podem danificar as células. Neste caso, o oxigênio molecular (O_2) sofre uma redução tetravalente, com incorporação de quatro elétrons, tendo como resultado a formação de água. Contudo, uma baixa porcentagem de oxigênio não é reduzido à água e acaba por sua vez sendo convertido em radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), sendo este caracterizado por possuir solubilidade limitada, e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), conhecido por ser o mais potente (BOVERIS, 1973; LEHNINGER, T.M., 2019). Além da produção endógena de espécies reativas e radicais livres, há também a formação proveniente de fontes exógenas, como poluição, tabagismo, exposição a raios UV, álcool, dentre outros fatores epigenéticos (LEHNINGER, T.M., 2019).

1.4.2 Defesas antioxidantes

Para combater o excesso de espécies reativas produzidas, o organismo possui um complexo sistema de defesa antioxidante com mecanismos eficientes para a detoxificação dessas moléculas, sendo formado por enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos. Embora estejam localizados e atuem em diferentes compartimentos, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas pelo corpo e desempenham os seguintes papéis:

- Sistema de defesa antioxidante enzimático: são um conjunto de enzimas responsáveis por prevenir, impedir ou controlar a formação dos radicais livres, sendo que cada uma atua em locais diferentes envolvidos na geração de ERO. Podem ser citadas 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 moléculas importantes para as defesas antioxidantes (glutathione reduzida-GSH, e NADPH, respectivamente) (PISOSCHI; POP, 2015).

- Sistema de defesa antioxidante não enzimático: são moléculas conhecidas como “sequestradores de radicais livres”, pois por meio de reações não enzimáticas convertem os radicais livres em substâncias não tóxicas (VASCONCELOS et al., 2014).

Em adição aos antioxidantes endógenos, a inclusão de alimentos que contém antioxidantes na dieta é de suma importância para diminuição do risco de desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres. Frutas, verduras e legumes são ricos em agentes antioxidantes, tais como carotenóides, flavonóides e vitaminas C, E e A. Essas vitaminas são responsáveis por sequestrarem os radicais livres com grande eficiência e também por realizarem proteção contra peroxidação lipídica nas membranas. Os flavonóides, por sua vez, inibem enzimas responsáveis pela produção de ânion superóxido, como a xantina-oxidase (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

1.4.3 Estresse oxidativo

Para manter o estado redox normal do meio, as defesas antioxidantes citadas anteriormente neutralizam as espécies reativas presentes no organismo. No entanto, em determinadas condições patológicas, é desencadeado o processo chamado de estresse oxidativo em virtude de um desbalanço entre a produção de espécies reativas e a capacidade antioxidante presente no organismo, ou seja, quando a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes (PISOSCHI; POP, 2015). Dessa forma, o estresse oxidativo pode ser proveniente da diminuição das defesas antioxidantes, da produção exacerbada de oxidantes ou da liberação de metais que acabam aumentando a produção (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2015).

Há situações em que as células conseguem se adaptar a este desequilíbrio, podendo tolerar o estresse oxidativo moderado através de um aumento na síntese de defesas antioxidantes. Contudo, se o desequilíbrio for grande e as defesas não forem suficientes, as espécies reativas acabarão causando danos celulares, oxidando componentes importantes como lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas, porém a célula ainda mantém a capacidade de atingir um estado de homeostase onde não ocorre morte

celular. Em último caso, em casos de estresse oxidativo exacerbado, pode ocorrer a morte celular por necrose ou apoptose. Em situação de necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular, como os antioxidantes CAT e GSH, e também pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e grupo heme de proteínas, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, e até mesmo induzi-las ao estresse oxidativo. Já na apoptose não há a liberação do conteúdo celular, pois um mecanismo intrínseco de morte programada é ativado (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2015).

O estresse oxidativo tem sido associado a diversas doenças, como, por exemplo, doenças de Alzheimer e Parkinson (DP) e diferentes tipos de câncer, dentre outras. Esta associação tem relação direta com a cadeia respiratória, pois ERO podem ser geradas a partir dela e causarem disfunção mitocondrial levando à peroxidação lipídica da membrana e dano ao DNA mitocondrial. Na DP, por exemplo, essa disfunção relaciona-se bastante com a progressão da doença, pois a deficiência de ATP induzida leva a uma redução da captação de dopamina com consequente aumento da degradação dopaminérgica nos neurônios.

I. 5 Metabolismo Energético

A mitocôndria é uma organela presente em células eucarióticas responsável por produzir equivalentes reduzidos e ATP. Esta capacidade é em parte decorrente de seu genoma próprio, responsável por codificar algumas proteínas que constituem os complexos proteicos, necessários para o fluxo de elétrons. As células utilizam a fosforilação oxidativa (OXPHOS) como principal forma de produzir ATP, necessário para realizar os processos biológicos. Assim, os elétrons capturados na glicólise e no ciclo de Krebs, por exemplo, são transferidos para a cadeia respiratória, a qual sintetiza ATP através da OXPHOS (LEHNINGER, T.M., 2019).

No processo da respiração mitocondrial, os elétrons são transferidos para a cadeia respiratória mitocondrial e usados para a redução do oxigênio. A energia contida nos elétrons transferidos ao longo dos complexos da cadeia é usada para bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Inicialmente, os complexos I e II captam os elétrons do NADH e FADH₂ e os transferem para a ubiquinona, sendo esta reduzida a ubiquinol. O complexo III em seguida recebe os elétrons do ubiquinol e transfere para a citocromo *c*. Na sequência, o complexo IV finaliza o processo reduzindo a molécula de oxigênio à água (LEHNINGER, T.M., NELSON, D. L. & COX, M. M.,

2019, p. 731). Como consequência do fluxo de elétrons, há um bombeamento de prótons através dos complexos I, III e IV para o espaço intermembrana, levando à diferença na concentração desse íon no espaço intermembrana em comparação à matriz mitocondrial. O acúmulo de prótons nesse espaço leva então à geração da força próton motora, composta pela diferença no pH transmembrana e diferença de potencial elétrico através da membrana; portanto, ela é gerada pelo movimento gradual de elétrons de estados de energia mais altos para mais baixos através dos carreadores de elétrons ligados à membrana. A ATP sintase sintetiza o ATP a partir de ADP e Pi com o uso da força próton-motora (BAGKOS, KOUFOPOULOS, PIPERI, 2014; LIPPE ET AL., 2019). Cabe salientar aqui que um excesso de mitocôndrias disfuncionais desequilibra a célula e pode alterar muitas funções fisiológicas, uma vez que reações e processos enzimáticos não podem ocorrer sem ATP. Defeitos no metabolismo energético cerebral e na captação de glicose têm sido relatados em doenças neurodegenerativas, mostrando o envolvimento da disfunção mitocondrial no dano neurológico observado nessas doenças (GARABADU et al., 2019).

I. 6 Controle de qualidade mitocondrial

As mitocôndrias são organelas com papel crucial na homeostase celular e que têm funções muito além de respiração celular. Elas estão envolvidas na síntese de ácidos graxos e aminoácidos, detoxificação de moléculas potencialmente tóxicas, sinalização para a imunidade inata e morte celular (BAKER, HAYNES, 2011).

Visto que as mitocôndrias são executoras centrais da morte celular, elas estão sujeitas a um rígido controle de qualidade com o intuito de evitar esse desfecho. Os mecanismos responsáveis por auxiliarem no estabelecimento da homeostase celular e por garantirem a manutenção do controle de qualidade dessa organela são vários e incluem: remoção de organelas danificadas, degradação de proteínas por proteossomo, biogênese, fissão e fusão mitocondrial. Já a eliminação seletiva de mitocôndrias inteiras é realizada pelo processo de mitofagia (MATSUSHIMA, LS KAGUNI, 2011).

A fusão e fissão (dinâmica mitocondrial) regulam a conectividade da rede mitocondrial, que depende das necessidades metabólicas de cada célula (MIETTINEN; BJÖRKLUND, 2017; RAMBOLD; PEARCE, 2018) (MIETTINEN, BJÖRKLUND, 2017; RAMBOLD, PEARCE, 2017). A fusão mitocondrial é mediada pelas proteínas mitofusina 1 (MFN1), mitofusina 2 (MFN2) e proteína da atrofia óptica 1 (OPA1). A

MFN1 e a MFN2 são GTPases responsáveis pela fusão das membranas mitocondriais externas; já a OPA1 relaciona-se à dinamina e é responsável pela fusão da membrana mitocondrial interna (NI et al., 2014). A fissão mitocondrial é mediada pela proteína 1 relacionada à dinamina (DRP1), uma proteína citosólica que pode ser recrutada para a membrana mitocondrial externa, realizando a divisão de uma mitocôndria em duas organelas filhas (WAI; LANGER, 2016)

A biogênese mitocondrial requer a entrega de proteínas mitocondriais codificadas pelo núcleo (NEMP) para a mitocôndria e é induzida por sinais endógenos e exógenos que aumentam a quantidade de NEMP através do fator de respiração celular 1 (NRF1). Algumas proteínas podem ser usadas como indicadoras de aumento de biogênese mitocondrial, como a citrato sintase e o canal de ânion dependente de voltagem (VDAC). Já a mitofagia é um processo de degradação especificamente de mitocôndrias danificadas, principalmente aquelas com potencial de membrana diminuído. A mitofagia requer muito da maquinaria utilizada na autofagia, incluindo a participação dos lisossomos (SULIMAN; PIANTADOSI, 2016).

Alterações nesses processos acompanhados de estresse oxidativo e disfunção bioenergética têm sido mostradas em diferentes distúrbios metabólicos hereditários (DJOUADI; BASTIN, 2019; HASKOVIC et al., 2020; LEIPNITZ; VARGAS; WAJNER, 2015). Neste contexto, já foi observado que os níveis das proteínas que medeiam os processos de fusão e fissão mitocondrial estão alterados em fibroblastos de pacientes com a deficiência da ETHE1 (GRINGS et al., 2019).

I. 7 Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2)

O fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), codificado pelo gene *NFE2L2*, é um fator de transcrição citosólico que possui um papel fundamental no controle do ambiente redox intracelular, regulando a expressão de enzimas antioxidantes e de vários genes importantes relacionados à homeostase redox. Em seu estado basal, o Nrf2 encontra-se ligado à proteína Keap1, a qual está ligada à culina 3 (CUL3), um membro das proteínas responsáveis por ubiquitinação. A CUL3 ativa então o processo de ubiquitinação e conseqüentemente a degradação proteossomal do Nrf2 (CUADRADO et al., 2019). Em situações de estresse oxidativo ou exposição de ativadores, o Nrf2 dissocia-se de Keap1 e, através de seu domínio Neh1, é transferido para um compartimento

nuclear, onde acaba se ligando a elementos de respostas antioxidantes (YAMAMOTO et al., 2018).

II. JUSTIFICATIVA

O quadro clínico observado na EE é predominantemente caracterizado por sintomas neurológicos graves e anormalidades cerebrais como dano nos gânglios basais, cuja patogênese não está totalmente definida. Além disso, não há tratamento eficaz para a doença, e os pacientes geralmente vão a óbito nos primeiros meses de vida. Portanto, torna-se relevante investigar os efeitos *ex vivo* do sulfeto de hidrogênio sobre o estriado a fim de elucidar os mecanismos patológicos envolvidos na EE e contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes. Deve ser considerado ainda que, apesar de estudos *in vitro* terem demonstrado que o sulfeto causa disfunção bioenergética mitocondrial, a influência deste metabólito sobre outros processos mitocondriais, tais como a fusão e a fissão, ainda não foram estudados.

III. OBJETIVOS

III.1 Geral

Avaliar os efeitos *ex vivo* do sulfeto sobre a homeostase redox, bioenergética e dinâmica mitocondrial em estriado de ratos jovens.

III.2 Específicos

Os seguintes parâmetros foram avaliados em estriado de ratos Wistar que receberam uma única injeção intraestriatal de sulfeto:

- Estresse oxidativo:
 - Concentrações GSH e as atividades das enzimas antioxidantes SOD, GPx, GST, G6PDH e GR (defesas antioxidantes);
 - Níveis de malondialdeído (MDA) (peroxidação lipídica);
 - Avaliação do conteúdo de Nrf2 por western blotting.
- Metabolismo energético:
 - Atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico: citrato sintase (CS), isocitrato desidrogenase (IDH), succinato desidrogenase (SDH) e malato desidrogenase (MDH);
 - Atividades dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial.
- Fusão e fissão mitocondrial:
 - Determinação do conteúdo proteico da mitofusina 1 (MFN1), proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), proteína relacionada à dinamina 1 (DRP1) e VDAC.
- Respiração mitocondrial:
 - Determinação da taxa de consumo de oxigênio. Avaliação dos estados 3, 4 e desacoplado.

IV. METODOLOGIA

IV. 1 Reagentes

Todos os reagentes químicos, incluindo sulfeto de hidrogênio (sulfeto), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), salvo indicação em contrário. O sulfeto foi dissolvido em água e o pH ajustado para 7,4 imediatamente antes dos experimentos.

IV. 2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 30 dias de vida obtidos no Biotério Central do Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12:12 h (luzes acesas das 07:00 às 19:00 h) em sala de colônia climatizada com temperatura constante (22 ± 1 °C), com livre acesso a água e ração comercial com 20% (p/p) de proteínas (Nuvilab CR-1®, PR, Brasil). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFRGS, Porto Alegre, Brasil (projeto de número 43171), e seguiu o Regulamento Nacional dos Direitos dos Animais (Lei 11.794/2008) e o Guia de Cuidados dos Institutos Nacionais de Saúde e Uso de Animais de Laboratório (publicação 85-23 do NIH, revisado em 1996). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados, bem como seu sofrimento, desconforto e estresse.

IV. 3 Administração de sulfeto

Ratos Wistar machos de 30 dias de idade foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e colocados em um aparelho estereotáxico após completa ausência de resposta a estímulos nociceptivos. Dois pequenos orifícios foram feitos em seu crânio e 2 μ L de sulfeto nas concentrações de 1 M (2 μ mol) ou 2 M (4 μ mol) foram injetados lentamente bilateralmente no corpo estriado durante 4 min por meio de uma agulha conectada a uma seringa Hamilton de 10 μ L por um tubo de polietileno. PBS foi injetado nos animais do grupo controle. Após as injeções, a agulha foi deixada no local por 1 min e então cuidadosamente removida. As soluções injetadas foram preparadas em água imediatamente antes do procedimento e tiveram seu

pH ajustado para 7,4. As coordenadas utilizadas para injeção intraestriatal, baseadas no atlas de Paxinos e Watson, foram as seguintes: 0,6 mm posterior ao bregma, 2,6 mm lateral à linha média e 4,5 mm ventral da dura-máter (PAXINOS; WATSON, 2006). A posição correta da agulha foi testada por meio da injeção de 0,5 µL de azul de metileno (4% em solução salina) e posterior análise histológica. Os animais foram mortos 30 min após a injeção de sulfeto ou PBS para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

IV. 4 Concentrações glutathiona reduzida (GSH)

O estriado foi homogeneizado (1:10 p/v) em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo KCl 140 mM. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 750 *xg* por 10 min a 4 °C e o sobrenadante resultante foi utilizado para a determinação das concentrações de GSH (BROWNE; ARMSTRONG, 1998). Cem microlitros de sobrenadantes do tecido (aproximadamente 45 µg de proteína) foram tratados com ácido metafosfórico 2% (1:1) e centrifugados por 10 min a 7.000 *xg* para desproteinização. Uma alíquota de sobrenadante (30 µL) foi então adicionada a um meio contendo 185 µL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0, com 5 mM de EDTA e 15 µL de o-ftaldialdeído (1 mg/mL em metanol), e incubada em sala escura por 15 min em temperatura ambiente. A fluorescência foi então medida a 350 (excitação) e 420 (emissão) nm em um leitor de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA, EUA). Uma curva de calibração foi preparada usando uma solução padrão de GSH (0,001–1 mM) e os resultados foram expressos em nmol GSH/mg de proteína.

IV. 5 Atividade de enzimas antioxidantes

Para a determinação das atividades das enzimas antioxidantes, as amostras foram preparadas da mesma forma que para a avaliação das concentrações de GSH. As alterações de absorbância para todas as enzimas foram registradas em um leitor de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA, EUA). As atividades específicas foram expressas como U/mg de proteína.

A atividade da GPx foi avaliada de acordo com Wendel (WENDEL, 1981), usando hidroperóxido de tert-butila como substrato e monitorando a oxidação do NADPH a 25 °C a 340 nm. O meio de reação continha sobrenadantes de tecido (aproximadamente 75 µg de proteína), tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, com EDTA 1 mM, azida

de sódio 0,4 mM, GSH 2 mM, GR 0,1 U/mL, NADPH 0,1 mM e hidroperóxido de tert-butila 0,5 mM. Uma unidade de GPx (U) é definida como 1 μ mol de NADPH consumido por minuto.

A atividade da GR foi medida pelo método descrito por Carlberg e Mannervik (CARLBERG; MANNERVIK, 1985), monitorando a oxidação do NADPH a 25 °C a 340 nm. O meio de reação continha sobrenadantes do tecido (aproximadamente 90 μ g de proteína), tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,5, EDTA 6,3 mM, glutathiona oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,1 mM.

A atividade da GST foi determinada pelo método descrito por Mannervik e Guthenberg (MANNERVIK; GUTHENBERG, 1981), usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e monitorando a formação de dinitrofenil-S-glutathiona a 25 °C a 340 nm. O meio de reação continha sobrenadantes do tecido (aproximadamente 60 μ g de proteína), tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, GSH 1 mM e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 1 mM.

A atividade da G6PDH foi avaliada de acordo com Clark e Leong (CLARK; LEONG, 1984), através da formação de NADPH a 25 °C a 340 nm. O meio de reação continha sobrenadantes do tecido (aproximadamente 45 μ g de proteína), tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, MgCl₂ 1,0 mM, NADP⁺ 0,05 mM e glicose-6-fosfato 0,1 mM.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com Marklund (MARKLUND, 1985) e foi baseada na auto-oxidação do pirogalol. Este processo é altamente dependente do superóxido, o substrato da SOD, sendo assim inibido por esta enzima. Dessa forma, a atividade da SOD pode ser medida indiretamente seguindo a absorvância do pirogalol a 25 °C a 420 nm. O meio reacional continha sobrenadantes do tecido (aproximadamente 45 μ g de proteína), tampão Tris 50 mM, pH 8,2, com EDTA 1 mM, CAT 80 U/mL e pirogalol 0,8 mM. Uma curva de calibração foi realizada usando SOD purificada.

IV. 6 Níveis de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica foi estimada medindo os níveis de MDA de acordo com o método descrito por Yagi com pequenas modificações (YAGI, 1998). Cem microlitros de sobrenadante do tecido foram tratados com 200 μ L de ácido tricloroacético 10% e 300 μ L de ácido tiobarbitúrico 0,67% (preparado em sulfato de sódio 7,1%) e incubados por 2 h em banho-maria fervente. Após o resfriamento da mistura, o pigmento foi extraído com

400 µL de butanol. A fluorescência da fase orgânica foi lida em 515 e 553 nm como comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente. Uma curva de calibração foi realizada usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano e submetida ao mesmo tratamento dos sobrenadantes. Os níveis de MDA foram expressos como nmol/mg de proteína.

IV. 7 Atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico

Para a medida das atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico CS, IDH, SDH e MDH, foram utilizados homogeneizados totais de estriado. O estriado foi homogeneizado (1:10 p/v) em tampão SET (sacarose 250 mM, EDTA 2,0 mM e base Trizma 10 mM, pH 7,4) e centrifugado a 800 *xg* durante 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram separados para determinação das atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico bem como dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

A atividade da CS foi medida de acordo com Shepherd e Garland (SHEPHERD; GARLAND, 1969) monitorando a redução de 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) a 37 °C a 412 nm. O meio de reação continha preparações mitocondriais (aproximadamente 2 µg de proteína), tampão fosfato de potássio 5 mM, pH 7,4, sacarose 300 mM, EGTA 1 mM, albumina bovina sérica 0,1%, MOPS 5 mM, Triton X-100 0,1%, DTNB 0,1 mM, acetil-CoA 0,1 mM e oxaloacetato 0,2 mM. Os resultados foram expressos em µmol de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB)/min/mg de proteína.

A atividade da SDH foi avaliada de acordo com Fischer et al. (FISCHER et al., 1985), medindo a redução de DCIP a 25 °C a 600 nm. O meio de reação continha sobrenadantes do tecido (aproximadamente 30 µg de proteína), tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 7,4, succinato de sódio 16 mM, azida sódica 4 mM, rotenona 7 µM, DCIP 8 µM e fenazinametossulfato 1 mM. A atividade da SDH foi expressa como nmol de DCIP reduzido/min/mg de proteína.

A atividade da IDH foi determinada de acordo com Plaut (PLAUT, 1969), seguindo a redução de NAD⁺ a 37 °C a 366 (excitação) e 450 (emissão) nm. O meio de reação continha sobrenadante (aproximadamente 15 µg de proteína), tampão Tris-HCl 33 mM, pH 7,4, rotenona 10 µM, MnCl₂ 1,2 mM, ADP 0,67 mM, Triton X-100 0,1%, NAD⁺ 0,6 mM e isocitrato 5 mM. Os resultados foram expressos em nmol NADH/min/mg de proteína.

A atividade da MDH foi medida de acordo com Kitto (BARRIE KITTO, 1969), seguindo a redução da fluorescência de NADH a 37 °C a 366 (excitação) e 450 (emissão)

nm. O meio de incubação continha sobrenadante (aproximadamente 1 µg de proteína), fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4, rotenona 10 µM, Triton X-100 0,1%, NADH 0,14 mM e oxaloacetato 0,3 mM. Os resultados foram expressos em µmol de NADH/min/mg de proteína.

IV. 8 Atividades dos complexos da cadeia respiratória

As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram medidas em sobrenadantes com concentrações de proteínas variando 1,5 a 4,0 mg proteína /mL. A atividade da NADH-desidrogenase (complexo I) foi determinada de acordo com Michelini et al. (2014). As atividades da succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP)-oxidoreductase (complexo II) e succinato: citocromo *c* oxidoreductase (complexo II-III) foram determinadas de acordo com Fischer e Maier (FISCHER; MAIER, 2015). A atividade da citocromo *c* oxidase (complexo IV) foi determinada de acordo com Rustin et al. (MICHELINI et al., 2014; RUSTIN et al., 1994). As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram calculadas como nmol/min/mg proteína.

IV. 9 Respiração mitocondrial

A taxa de consumo de oxigênio foi medida em homogeneizados brutos de estriado (2 mg de tecido), através do protocolo de titulação do inibidor do desacoplador de substrato (SUIT) (MAKRECKA-KUKA et al., 2015), usando um Oroboros Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Áustria), em um sistema controlado termostaticamente e câmaras de incubação com agitação magnética (MAKRECKA-KUKA et al., 2015). Substratos ligados a NADH (5 mM de piruvato, 0,5 mM de malato e 10 mM de glutamato-PMG) foram primeiramente adicionados à câmara, seguidos por 500 µM de ADP (estado 3 PMG). Após, 10 mM de succinato (substrato ligado a FADH₂) foi adicionado (estado 3 PMG+S). Para avaliar o estado 4 da respiração, 1 µg/mL de oligomicina foi adicionado à câmara. Em seguida, CCCP 1,5 µM (três pulsos de 0,5 µM) foi titulado para determinar a capacidade do sistema de transferência de elétrons (ETS) (respiração desacoplada PMG+S). Rotenona 1 µM (inibidor do complexo I) foi utilizada para obter a respiração desacoplada estimulada por succinato (respiração desacoplada S). Finalmente, a antimicina A foi adicionada à câmara para determinação do consumo residual de oxigênio. Todos os parâmetros foram corrigidos pelo consumo residual de oxigênio. Os

fluxos de oxigênio em tempo real foram calculados usando o DatLab7 (Oroboros Instruments, Áustria) e expressos como $\text{pmol O}_2 \text{ flux.s}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$.

IV. 10 Análises de western blotting

Para a análise do imunoconteúdo de algumas proteínas de interesse, foram utilizados homogeneizados totais ou frações nucleares do estriado de ratos submetidos a injeção de H_2S ou NaCl . Para homogeneizados totais, o estriado foi homogeneizado (1:10) e lisado em tampão RIPA contendo inibidores de protease e fosfatase (ortovanadato de sódio 1 mM, aprotinina 1 mM e coquetel inibidor de protease 1%) e centrifugado a 12.000 *xrpm* por 10 min a 4 °C.

Para a preparação das frações nucleares, as amostras foram inicialmente homogeneizadas (1:10, p/v) em tampão hipotônico (HEPES 10 mM, MgCl_2 1,5 mM, KCl 1 mM e DTT 1 mM mais coquetel inibidor de protease e fosfatase 1%, PMSF 1 mM e IGEPAL CA-630 0,5%) e incubados em gelo durante 15 min. Após uma série de centrifugações, o sedimento final foi ressuspenso em 100 μL de tampão hipertônico (HEPES 20 mM, MgCl_2 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, glicerol 20%, NaCl 420 mM e DTT 1 mM mais 1% de coquetel inibidor de protease e fosfatase e PMSF 1 mM). Outra centrifugação a 14.000 *xg* por 10 min a 4 °C foi realizada e o sobrenadante (fração nuclear) foi coletado. A concentração de proteína foi determinada e as amostras foram desnaturadas em tampão de amostra Laemmli 2x (#1610737, Bio-Rad, EUA) e 2-mercaptoetanol 10%.

Quantidades iguais de proteína (30-60 μg /poço) foram fracionadas por SDS-PAGE e eletrotransferidas em membranas de nitrocelulose. Depois de verificar a quantidade de proteína e a eficiência do eletroblotting através da coloração de Ponceau S, a membrana foi bloqueada em solução salina tamponada com Tween-Tris (TTBS: Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, NaCl 0,9% e Tween-20 0,1%) contendo 5 % de albumina. As membranas foram então incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primário para Nrf2 (1:1.000; ab31163, Abcam, UK), DRP1 (1:1,000; ab56788, Abcam, UK), MFN1; (1:1,000; ab126575, Abcam, Cambridge, UK), OPA1 (1:1,000; #80471, Cell Signaling, MA, USA) e VDAC1 (1:1,000; ab154856, Abcam, UK), e finalmente lavados com TTBS. Anticorpo secundário anti-coelho (1:10.000; sc-2030, Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA) ou anti-camundongo (1:5000; sc-2031, Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA) ligado à peroxidase IgG foi então incubado com as membranas por um período adicional

de 2 h. As membranas foram lavadas novamente e a imunorreatividade foi detectada usando o substrato de detecção de quimioluminescência (ECL) (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). A quantificação das proteínas foi normalizada com anti-GAPDH (1:5,000; #2118, Cell Signaling, MA, USA) ou anti- β -actina (1:20,000; A1978, Sigma Aldrich, MO, USA). Uma câmera “charge-coupled device (CCD)” (ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare, EUA) foi utilizada para a detecção de sinais de quimioluminescência e a análise densitométrica foi realizada com o software NIH ImageJ Analysis. Os blots foram desenvolvidos para serem lineares na faixa usada para densitometria.

IV. 11 Determinação de proteínas

O método de Lowry et al. foi usado para medir o conteúdo de proteína (LOWRY et al., 1951).

IV. 12 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste t de Student para amostras não pareadas quando P foi significativo. Quando os dados não apresentaram distribuição normal, foi usado o teste de Mann Whitney para comparação das médias entre dois grupos (controle x sulfeto). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.

VI. DISCUSSÃO

A EE é uma doença neurometabólica rara de caráter autossômico recessivo gravemente debilitante caracterizada por alterações psicomotoras e mentais, sintomas cognitivos e anormalidades cerebrais que frequentemente levam à morte do paciente (DI MEO et al., 2017). Evidências recentes demonstraram que o acúmulo de sulfeto de hidrogênio replica em modelos animais a maioria das anormalidades neurológicas observadas em pacientes acometidos pela EE (GRINGS; WAJNER; LEIPNITZ, 2022), sendo, portanto, uma ferramenta útil para o estudo da fisiopatologia desta doença. Neste contexto, trabalhos têm mostrado que o sulfeto inibe a atividade da citocromo *c* oxidase e da creatina quinase, e induz estresse oxidativo em cérebro de ratos (ALVORCEM et al., 2021; CARDOSO et al., 2017; HILL et al., 1984). Ainda, deve ser enfatizado que um melhor entendimento dos mecanismos patológicos induzidos pelos compostos potencialmente tóxicos, incluindo o sulfeto, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para a doença.

Com esse intuito, no presente trabalho, investigamos os efeitos de uma administração intraestriatal de sulfeto, em duas doses, sobre parâmetros de estresse oxidativo, metabolismo energético e dinâmica mitocondrial no corpo estriado de ratos jovens. Observamos que o sulfeto alterou as atividades de diferentes enzimas antioxidantes, possivelmente causando estresse oxidativo em nosso modelo, o que corrobora dados anteriores demonstrando que este mecanismo é relevante para a fisiopatologia da EE (DJOUADI; BASTIN, 2019; GRINGS; WAJNER; LEIPNITZ, 2022).

O estresse oxidativo é uma condição decorrente de um desequilíbrio na produção de compostos pró-oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, sendo, portanto, decorrente da geração excessiva de radicais livres ou detrimento da velocidade de remoção desses (BARBOSA et al., 2010; GALINIÁK et al., 2023). Neste contexto, o sulfeto, em ambas as doses testadas, inibiu as atividades da SOD, GST e GR. Na menor dose, também reduziu a atividade da GPx. Apesar de não termos estudado o mecanismo responsável por esta inibição, sugere-se que os níveis elevados de ERO possam ter oxidado aminoácidos críticos dessas enzimas. Dessa forma, a diminuição da atividade destas enzimas pode ser proveniente da produção excessiva de espécies reativas induzidas por sulfeto (STADTMAN; LEVINE, 2003). Na dose maior de sulfeto, o efeito sobre uma única enzima foi o oposto, havendo um aumento significativo na atividade da GPx. No

momento, não podemos explicar as exatas razões pela qual essa atividade aumentou, porém o aumento provavelmente se deve por conta de um mecanismo adaptativo da célula frente à exposição exacerbada do metabólito. Por outro lado, não observamos alterações nos níveis do antioxidante enzimático mais abundante, a GSH, que desempenha um papel fundamental na manutenção do estado redox intracelular protegendo os grupos sulfidrilas celulares cruciais de proteínas incluindo enzimas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Também não encontramos alteração na lipoperoxidação (níveis de MDA), uma vez que o sulfeto não alterou os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no estriado de ratos de 30 dias de vida.

A sinalização do fator Nrf2 tem sido amplamente utilizada como alvo terapêutico em diferentes doenças relacionadas ao estresse oxidativo e inflamação. Estudos têm demonstrado que moduladores de Nrf2 provocam efeitos benéficos em doenças autoimunes, hepáticas, renais e até mesmo câncer (ADELUSI et al., 2020; PANIERI et al., 2020; SHARMA; KAUR; SINGH, 2020). Sua forma de atuação se dá por meio de sua liberação da proteína Keap1. Inicialmente, o Nrf2 encontra-se em seu estado inativo em uma célula saudável ligado ao seu inibidor Keap1 no citoplasma. Quando as células são estimuladas por ERO em uma situação de estresse oxidativo, o Nrf2 se dissocia da Keap1 devido à modificação de dois dos resíduos de cisteína da Keap1. Na sequência, o Nrf2 transloca-se para o núcleo, heterodimeriza com as proteínas do fibrossarcoma musculoesquelético através do domínio Neh1 e transativa um elemento de resposta antioxidante (CHEN et al., 2022). Já é estabelecido que esta interação entre Nrf2 e elemento de resposta antioxidante regula a expressão de cerca de 250 genes, com destaque para os genes envolvidos nas respostas ao estresse oxidativo (ADELUSI et al., 2020; CUADRADO et al., 2019; PANIERI et al., 2020). Uma vez ativado, o Nrf2 regula, por exemplo, a ativação da NADPH quinona desidrogenase (NQO1) e da heme oxigenase-1 (HO-1), sendo esta última seu principal alvo. É estabelecido também que existe uma regulação da expressão de enzimas envolvidas na síntese e utilização da GSH, como as subunidades da glutamato-cisteína ligase, GR, GPx, diversas GST e regulação da expressão de algumas oxidoredutases do citocromo P450 (CUADRADO et al., 2019). Visto que o sulfeto modificou a atividade de diferentes enzimas antioxidantes, determinamos os efeitos desse metabólito sobre o Nrf2. Encontramos uma redução do conteúdo proteico nuclear de Nrf2 causado pelo sulfeto no estriado de ratos, implicando que o metabólito diminui a capacidade antioxidante celular.

Além da avaliação de estresse oxidativo, realizamos análises referentes ao metabolismo energético. Considerando que uma das etapas importantes no processo de respiração celular é o ciclo do ácido cítrico, o qual possui enzimas distintas que exercem funções específicas, e as tendências nas atividades dessas enzimas refletem a função das mitocôndrias e sua capacidade de sintetizar ATP (JIN et al., 2014), avaliamos as atividades de algumas enzimas do ciclo. Percebemos que na dose de 2 μmol , o sulfeto aumentou a atividade da CS. A enzima em questão é considerada uma enzima catalítica essencial envolvida no ciclo do ácido cítrico e sua atividade é frequentemente usada para indicar o estado funcional e o conteúdo mitocondrial; portanto, seu aumento pode ser recorrente de um mecanismo visando compensar um possível dano bioenergético ou até mesmo representar um aumento na biogênese mitocondrial (RASHEED; TARJAN, 2018). Já na maior dose de 4 μmol , o sulfeto causou um aumento significativo na atividade da SDH, possivelmente também por conta de um mecanismo adaptativo. Esta enzima também faz parte do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial catalisando a oxidação de succinato a fumarato e promovendo a geração de FADH_2 (ALHINDI et al., 2019; JACQUES et al., 2020). Nossos resultados indicam que mecanismos compensatórios estão sendo induzidos a fim de manter a homeostase energética celular.

A inibição da atividade de quaisquer dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial pode causar aumento na produção de ERO e essas, por sua vez, podem exacerbar o mau funcionamento da cadeia devido à inibição da atividade dos diferentes complexos oxigênio (WANG; HEKIMI, 2015). Visto que as atividades de diferentes enzimas antioxidantes foram alteradas pelo sulfeto, indicando aumento na geração de espécies reativas, decidimos determinar se o sulfeto poderia modificar a atividade dos complexos da cadeia respiratória e parâmetros respiratórios mitocondriais avaliados pelo consumo de oxigênio (WANG; HEKIMI, 2015). Observamos que, na dose de 2 μmol , o sulfeto não alterou as atividades dos complexos da cadeia respiratória, porém com a dose mais elevada, houve uma inibição do complexo IV, efeito decorrente provavelmente da liberação dos radicais livres gerados pelo sulfeto (JIANG et al., 2016). Já foi relatado que a inibição induzida pelo metabólito neste complexo é mediada por reações com os centros heme e cobre, pois ambos são capazes de ligar sulfeto (DI MEO et al., 2011; TIRANTI et al., 2009). Nosso resultado demonstra que o metabólito danifica a bioenergética mitocondrial, possivelmente prejudicando a síntese de ATP, o que está de acordo com estudos anteriores realizados *in vivo* em cérebro de animais, músculo, coração e intestino (DI MEO et al., 2011; TIRANTI et al., 2009). Além de estudos com ratos, também já foi

demonstrado que em cérebro e músculo de camundongos *Ethel^{-/-}* há uma redução progressiva no conteúdo de subunidades do complexo IV codificadas tanto por DNA nuclear quanto mitocondrial, que é atribuída à degradação acelerada dessas proteínas (DI MEO et al., 2011). Além disso, estudos mais recentes de nosso grupo de pesquisa relataram uma diminuição do consumo de oxigênio mitocondrial induzida pelo sulfeto no cerebelo de ratos (DE MOURA ALVORCEM et al., 2019). Essas descobertas indicam fortemente que o H₂S perturba a respiração mitocondrial no cérebro e em outros tecidos. Nossos achados confirmam isto, uma vez que observamos que o sulfeto perturbou a transferência de elétrons da cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa no estriado de ratos. Especificamente, o sulfeto reduziu o estado 3, 4 e desacoplado da respiração mitocondrial na presença de PMG e succinato, e novamente isto é consistente com estudos que demonstram que este metabólito inibe a atividade da citocromo *c* oxidase em diferentes tecidos animais e em fibroblastos de indivíduos com diagnóstico de EE (GRINGS; WAJNER; LEIPNITZ, 2022). Outro estudo ainda mostrou que o sulfeto inibe a respiração mitocondrial e dissipa o potencial da membrana mitocondrial no cerebelo de ratos (DE MOURA ALVORCEM et al., 2019).

Em relação à morfologia e funcionalidade mitocondrial, sabemos que esta é mantida através de um equilíbrio entre fissão e fusão (dinâmica mitocondrial), biogênese e mitofagia (EISNER; PICARD; HAJNÓCZKY, 2018). A fusão e a fissão mitocondrial, dependentes de enzimas GTPases, consistem, respectivamente, na formação de uma organela alongada pela fusão de duas ou mais mitocôndrias e na divisão de uma mitocôndria em duas mitocôndrias filhas (TILOKANI et al., 2018). Durante a fusão, a MFN1 e a MFN2, e a proteína de atrofia óptica 1 (OPA1) medeiam a fusão da membrana mitocondrial externa e interna, respectivamente. Por outro lado, a DRP1 é considerada um ator crucial no processo de fissão, formando oligômeros ao redor das mitocôndrias para contraí-las. Os túbulos do retículo endoplasmático participam da constrição mitocondrial inicial, facilitando assim a oligomerização da DRP1 (EISNER; PICARD; HAJNÓCZKY, 2018; TILOKANI et al., 2018).

As desregulações dos processos que alteram a morfologia mitocondrial contribuem para a patogênese da EE e outras doenças que afetam o sistema nervoso central (DJOUADI; BASTIN, 2019; GRINGS; WAJNER; LEIPNITZ, 2022). Portanto, quantificamos os níveis de proteínas relacionadas à dinâmica mitocondrial no estriado de ratos. Em nossos resultados não encontramos diferença significativa na proteína DRP1, porém tivemos um aumento considerável em OPA1. A proteína OPA1 está envolvida em

diferentes funções críticas subjacentes à integridade da membrana mitocondrial através da fusão da membrana mitocondrial interna, incluindo a manutenção da cadeia respiratória mitocondrial e do potencial de membrana, bem como sinalização apoptótica (CIPOLAT et al., 2006; FREZZA et al., 2006). Portanto, o aumento de OPA1 encontrado pode ser proveniente de uma resposta compensatória em virtude de uma situação de grave estresse celular, visto que o estresse oxidativo pode causar fissão mitocondrial excessiva, resultando em alterações e disfunções estruturais mitocondriais (REDDY, 2014). É importante destacar também que OPA1 pode sinalizar a liberação apoptótica do citocromo *c* com o início da remodelação das cristas, independente do processo necessário para o início da fusão mitocondrial. Especificamente, a OPA1 pode sinalizar a refusão de mitocôndrias disfuncionais, o que pode preservar a integridade neuronal para preservar os tecidos neuronais (CHO et al., 2022).

Já a fusão mitocondrial mediada pela MFN1 e MFN2 permite a ligação das membranas mitocondriais externas opostas. A fusão de duas mitocôndrias danificadas que abrigam mutações em genes diferentes pode permitir que a complementação funcional ocorra pela difusão de componentes de RNA e proteínas através das mitocôndrias recém-formadas, resgatando a função mitocondrial (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012). Em nossos estudos, encontramos uma diminuição significativa da MFN1 causada pelo sulfeto, indicando uma disfunção mitocondrial grave, com alteração no controle de qualidade. Esses resultados corroboram um estudo recente que mostrou em fibroblastos com deficiência da ETHE1 alterações nos níveis de MFN1, MFN2 e massa mitocondrial. Esses dados em conjunto sugerem alterações na morfologia mitocondrial.

Vale destacar que nossos achados confirmaram investigações realizadas em fibroblastos humanos deficientes para a ETHE1 demonstrando o papel do distúrbio bioenergético mitocondrial, do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial na EE (GRINGS et al., 2019).

VII. CONCLUSÃO

Nossos achados mostram, pela primeira vez, que a administração de sulfeto induz estresse oxidativo, disfunção bioenergética e distúrbios na dinâmica mitocondrial em estriado de ratos jovens (Figura 13). Portanto, presumimos que esses mecanismos patológicos contribuam, ao menos em parte, para a fisiopatologia do dano aos gânglios basais comumente observado em pacientes acometidos pela EE. Além disso, estão de acordo com evidências recentes em animais e humanos que demonstraram que o sulfeto perturba as funções mitocondriais e a homeostase redox (GRINGS; WAJNER; LEIPNITZ, 2022). Acreditamos ainda que nossos resultados identificam novos alvos moleculares que podem ser utilizados no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a EE.

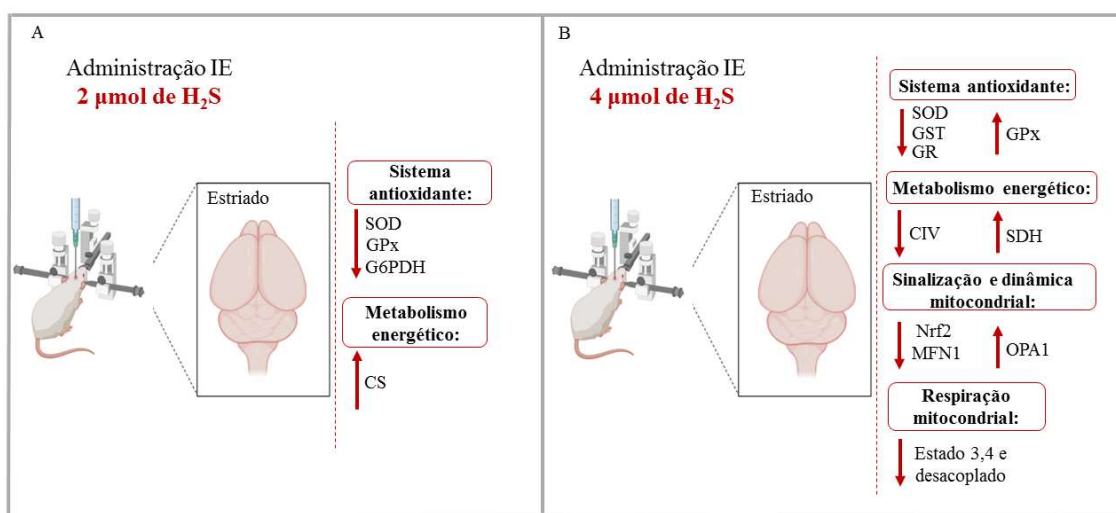


Figura 13: **a)** A administração intraestriatal (IE) de H_2S ($2 \mu\text{mol}$) alterou a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e citrato sintase (CS). **b)** A administração IE de H_2S ($4 \mu\text{mol}$) alterou a atividade enzimática da SOD, glutaciona-S-transferase (GST), glutaciona redutase (GR), GPx e succinato desidrogenase (SDH). Também alterou a atividade do complexo IV (CIV) da cadeia respiratória, bem como diminuiu a respiração mitocondrial. Ainda, alterou o conteúdo proteico de Nrf2, mitofusina 1 (MFN1-fusão) e proteína da atrofia óptica 1 (OPA1-fusão).

VIII. PERSPECTIVAS

- Avaliar os efeitos da administração do sulfeto sobre os outros processos do controle de qualidade mitocondrial, nomeadamente a biogênese mitocondrial e mitofagia, em estriado de ratos.

- Avaliar os efeitos da administração do sulfeto sobre a homeostase bioenergética e redox e processos do controle de qualidade mitocondrial em estriado de ratos eutanasiados em diferentes tempos após a injeção do metabólito.

- Avaliar a influência do dimetilfumarato (ativador do Nrf2) sobre os efeitos da administração de sulfeto em estriado de ratos.

VIII. REFERÊNCIAS

- ALVORCEM, L. M. et al. Ethylmalonic acid impair bioenergetics by disturbing succinate and glutamate oxidation and induces mitochondrial permeability transition pore opening in rat cerebellum. **Journal of Neurochemistry**, v.158, n. 2, p. 262-281, 2021.
- BARTH et al. **Journal of Inherited Metabolic Disorder**, v. 33, p. 443-453, 2010.
- BAKER, HAYNES, CM. **Trends in Biochemical Sciences**, v.36 (5), p. 254-261, 2011
- ADELUSI, T. I. et al. Keap1/Nrf2/ARE signaling unfolds therapeutic targets for redox imbalanced-mediated diseases and diabetic nephropathy. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 123, p. 109732, mar. 2020.
- ALHINDI, Y. et al. Low Citrate Synthase Activity Is Associated with Glucose Intolerance and Lipotoxicity. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2019, p. e8594825, 3 mar. 2019.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629–643, ago. 2010.
- BARRIE KITTO, G. [19] Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenases from chicken and tuna heart: [EC 1.1.1.37 l-Malate: NAD oxidoreductase]. Em: **Methods in Enzymology**. Citric Acid Cycle. [s.l.] Academic Press, 1969. v. 13p. 106–116.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707–716, 15 jul. 1973.
- BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced Glutathione and Glutathione Disulfide. Em: ARMSTRONG, D. (Ed.). **Free Radical and Antioxidant Protocols**. Methods in Molecular BiologyTM. Totowa, NJ: Humana Press, 1998. p. 347–352.
- CAO, X. et al. A Review of Hydrogen Sulfide Synthesis, Metabolism, and Measurement: Is Modulation of Hydrogen Sulfide a Novel Therapeutic for Cancer? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 31, n. 1, p. 1–38, jul. 2019.
- CARDOSO, G. M. F. 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. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 9, p. 2192–2201, set. 2017.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. [59] Glutathione reductase. Em: **Methods in Enzymology**. Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds. [s.l.] Academic Press, 1985. v. 113p. 484–490.
- CHEN, Z. et al. Activated Nrf-2 Pathway by Vitamin E to Attenuate Testicular Injuries of Rats with Sub-chronic Cadmium Exposure. **Biological Trace Element Research**, v. 200, n. 4, p. 1722–1735, 1 abr. 2022.

CHO, C. et al. Reductions in Hydrogen Sulfide and Changes in Mitochondrial Quality Control Proteins Are Evident in the Early Phases of the Corneally Kindled Mouse Model of Epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1434, jan. 2022.

CIPOLAT, S. et al. Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 163–175, 14 jul. 2006.

CUADRADO, A. et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 18, n. 4, p. 295–317, abr. 2019.

DE MOURA ALVORCEM, L. 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**, v. 47, p. 141–150, jul. 2019.

DI MEO, I. et al. Chronic Exposure to Sulfide Causes Accelerated Degradation of Cytochrome c Oxidase in Ethylmalonic Encephalopathy. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 2, p. 353–362, 15 jul. 2011.

DIONISI-VICI, C. et al. Liver transplant in ethylmalonic encephalopathy: a new treatment for an otherwise fatal disease. **Brain**, v. 139, n. 4, p. 1045–1051, 1 abr. 2016.

DJOUADI, F.; BASTIN, J. Mitochondrial Genetic Disorders: Cell Signaling and Pharmacological Therapies. **Cells**, v. 8, n. 4, p. 289, abr. 2019.

EBRAHIMI-FAKHARI, D.; VAN KARNEBEEK, C.; MÜNCHAU, A. Movement Disorders in Treatable Inborn Errors of Metabolism. **Movement Disorders**, v. 34, n. 5, p. 598–613, 2019.

EISNER, V.; PICARD, M.; HAJNÓCZKY, G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 7, p. 755–765, jul. 2018.

ERSOY, M.; TIRANTI, V.; ZEVIANI, M. Ethylmalonic encephalopathy: Clinical course and therapy response in an uncommon mild case with a severe ETHE1 mutation. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 25, p. 100641, dez. 2020.

Ethylmalonic acid impairs bioenergetics by disturbing succinate and glutamate oxidation and induces mitochondrial permeability transition pore opening in rat cerebellum. [s.d.].

FERREIRA, C. R. et al. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 1, p. 102–106, 1 jan. 2019.

FERRIGNO, A. et al. MCD Diet Modulates HuR and Oxidative Stress-Related HuR Targets in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, p. 9808, jan. 2023.

FILADI, R.; THEUREY, P.; PIZZO, P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. **Cell Calcium**, v. 62, p. 1–15, 1 mar. 2017.

FISCHER, J. C. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, v. 153, n. 1, p. 23–36, nov. 1985.

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. e610813, 5 mar. 2015.

FREZZA, C. et al. OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 177–189, 14 jul. 2006.

GALINIAK, S. et al. Serum Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Cancers**, v. 15, n. 15, p. 3995, jan. 2023.

GALOSI, S.; NARDECCHIA, F.; LEUZZI, V. Treatable Inherited Movement Disorders in Children: Spotlight on Clinical and Biochemical Features. **Movement Disorders Clinical Practice**, v. 7, n. 2, p. 154–166, 2020.

GOVINDARAJ, P. et al. Child Neurology: Ethylmalonic encephalopathy. **Neurology**, v. 94, n. 12, p. e1336–e1339, 24 mar. 2020.

GRINGS, M. et al. ETHE1 and MOCS1 deficiencies: Disruption of mitochondrial bioenergetics, dynamics, redox homeostasis and endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in patient fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12651, 2 set. 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. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 42, n. 3, p. 565–575, 1 abr. 2022.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2015) Free Radicals in Biology and Medicine. 5th Edition, Oxford University Press, New York. - References - Scientific Research Publishing. Disponível em: <[https://www.scirp.org/\(S\(vtj3fa45qm1ean45wffcz5%205\)\)/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1753639](https://www.scirp.org/(S(vtj3fa45qm1ean45wffcz5%205))/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1753639)>. Acesso em: 23 jun. 2023.

HASKOVIC, M. et al. Pathophysiology and targets for treatment in hereditary galactosemia: A systematic review of animal and cellular models. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 43, n. 3, p. 392–408, 2020.

JACQUES, M. et al. Mitochondrial respiration variability and simulations in human skeletal muscle: The Gene SMART study. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 2, p. 2978–2986, 2020.

JEŽEK, P. et al. Mitochondrial Cristae Morphology Reflecting Metabolism, Superoxide Formation, Redox Homeostasis, and Pathology. **Antioxidants & Redox Signaling**, 15 fev. 2023.

JIANG, J. et al. Hydrogen Sulfide—Mechanisms of Toxicity and Development of an Antidote. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 20831, 15 fev. 2016.

JIN, P. et al. Oxalic acid alleviates chilling injury in peach fruit by regulating energy metabolism and fatty acid contents. **Food Chemistry**, v. 161, p. 87–93, 15 out. 2014.

KASHIMA, D. T. et al. An atypically mild case of ethylmalonic encephalopathy with pathogenic ETHE1 variant. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 191, n. 6, p. 1614–1618, 2023.

- LEIPNITZ, G.; VARGAS, C. R.; WAJNER, M. Disturbance of redox homeostasis as a contributing underlying pathomechanism of brain and liver alterations in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 38, n. 6, p. 1021–1028, 2015.
- LIU, D.; KE, Z.; LUO, J. Thiamine Deficiency and Neurodegeneration: the Interplay Among Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Autophagy. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 5440–5448, 1 set. 2017.
- LOWRY, OLIVERH. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1 nov. 1951.
- MAK, C. M. et al. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 50, n. 6, p. 142–162, 1 nov. 2013.
- MANNERVIK, B.; GUTHENBERG, C. [28] Glutathione transferase (human placenta). Em: **Methods in Enzymology**. Detoxication and Drug Metabolism: Conjugation and Related Systems. [s.l.] Academic Press, 1981. v. 77p. 231–235.
- MARKLUND, S. L. Pyrogallol Autoxidation. Em: **Handbook Methods For Oxygen Radical Research**. [s.l.] CRC Press, 1985.
- MIETTINEN, T. P.; BJÖRKLUND, M. Mitochondrial Function and Cell Size: An Allometric Relationship. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 6, p. 393–402, jun. 2017.
- MINERI, R. et al. Identification of new mutations in the ETHE1 gene in a cohort of 14 patients presenting with ethylmalonic encephalopathy. **Journal of Medical Genetics**, v. 45, n. 7, p. 473–478, 1 jul. 2008.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 8 Porto Alegre: Artmed, 2022, 1278 p.740.
- ORTIGOZA-ESCOBAR, J. D. A Proposed Diagnostic Algorithm for Inborn Errors of Metabolism Presenting With Movements Disorders. **Frontiers in Neurology**, v. 11, 2020.
- PANIERI, E. et al. Potential Applications of NRF2 Modulators in Cancer Therapy. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 3, p. 193, 25 fev. 2020.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition**. [s.l.] Elsevier, 2006.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 5 jun. 2015.
- PLAUT, G. W. E. [8] Isocitrate dehydrogenase (DPN-specific) from bovine heart. Em: **Methods in Enzymology**. Citric Acid Cycle. [s.l.] Academic Press, 1969. v. 13p. 34–42.
- RAMBOLD, A. S.; PEARCE, E. L. Mitochondrial Dynamics at the Interface of Immune Cell Metabolism and Function. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 1, p. 6–18, jan. 2018.

- RASHEED, M. R. H. A.; TARJAN, G. Succinate Dehydrogenase Complex: An Updated Review. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 142, n. 12, p. 1564–1570, 5 out. 2018.
- REDDY, P. H. Inhibitors of Mitochondrial Fission as a Therapeutic Strategy for Diseases with Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 40, n. 2, p. 245–256, 1 jan. 2014.
- RUSTIN, P. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**, v. 228, n. 1, p. 35–51, 1 jul. 1994.
- SHARMA, V.; KAUR, A.; SINGH, T. G. Counteracting role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway in Alzheimer's disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 129, p. 110373, set. 2020.
- SHEPHERD, D.; GARLAND, P. B. [2] Citrate synthase from rat liver. [EC 4.1.3.7 Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. **Methods in Enzymology**, v. 13, n. C, p. 11–16, 1969.
- SILVA, C. T. DA; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38–42, 2014.
- STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3, p. 207–218, 1 dez. 2003.
- SULIMAN, H. B.; PIANTADOSI, C. A. Mitochondrial Quality Control as a Therapeutic Target. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 1, p. 20–48, jan. 2016.
- TILOKANI, L. et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. **Essays in Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 341–360, 20 jul. 2018.
- TIRANTI, V. et al. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. **Nature Medicine**, v. 15, n. 2, p. 200–205, fev. 2009.
- VASCONCELOS, T. B. DE et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, 2014.
- WAI, T.; LANGER, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 27, n. 2, p. 105–117, fev. 2016.
- WANG, Y.; HEKIMI, S. Mitochondrial dysfunction and longevity in animals: Untangling the knot. **Science**, v. 350, n. 6265, p. 1204–1207, 4 dez. 2015.
- WENDEL, A. [44] Glutathione peroxidase. Em: **Methods in Enzymology**. Detoxication and Drug Metabolism: Conjugation and Related Systems. [s.l.] Academic Press, 1981. v. 77p. 325–333.
- YAGI, K. Simple Procedure for Specific Assay of Lipid Hydroperoxides in Serum or Plasma. Em: ARMSTRONG, D. (Ed.). **Free Radical and Antioxidant Protocols**. Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 1998. p. 107–110.
- YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1062–1065, 31 ago. 2012.

ZEA VERA, A.; GROPMAN, A. L. Surgical treatment of movement disorders in neurometabolic conditions. **Frontiers in Neurology**, v. 14, 2023.