

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

Ângela Beatris Zemniçak

**Avaliação dos efeitos *in vitro* do ácido fitânico sobre parâmetros da função  
mitocondrial em coração de ratos**

Porto Alegre

2022

Ângela Beatris Zemniak

**Avaliação dos efeitos *in vitro* do ácido fitânico sobre parâmetros da  
função mitocondrial em coração 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 mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Umpierrez Amaral

Porto Alegre

2022

## CIP - Catalogação na Publicação

Zemniacak, Ângela Beatris  
Avaliação dos efeitos in vitro do ácido fitânico  
sobre parâmetros da função mitocondrial em coração de  
ratos / Ângela Beatris Zemniacak. -- 2022.  
66 f.  
Orientador: Alexandre Umpierrez Amaral.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Doenças Peroxissomais. 2. Ácido Fitânico. 3.  
Doença de Refsum. 4. Bioenergética Mitocondrial. 5.  
Homeostase do Cálcio. I. Amaral, Alexandre Umpierrez,  
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A todos que me ajudaram a  
chegar até aqui, principalmente  
aos meus pais.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Bioquímica, por fornecer todo o suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho e aos funcionários e professores por todo o profissionalismo e competência.

Ao meu orientador professor Alexandre, por todos os ensinamentos, incentivo, carinho e respeito que venho recebendo ao longo dos últimos anos.

À Ana Cristina Roginski, por toda a ajuda, paciência, trabalho duro e por partilhar da sua experiência de bancada, conhecimento e amizade que vem sendo essencial na minha formação como pesquisadora.

Aos meus colegas de laboratório, que estão sempre dispostos a me ajudar.

Aos meus tios, pela ajuda em Porto Alegre e os convites de final de semana.

Aos meus pais, que sempre acreditaram e incentivaram todos meus sonhos.

# SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	2
<b>RESUMO</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>I.1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
I.1.1. Peroxissomos e doenças peroxissomais .....	9
I.1.2. Metabolismo do ácido fitânico (Fit) .....	9
I.1.3. Doença de Refsum .....	11
I.1.3.1. Achados clínicos .....	12
I.1.3.2. Diagnóstico .....	12
I.1.3.3. Tratamento .....	13
I.1.3.4. Fisiopatologia .....	13
I.1.4. Ciclo do ácido cítrico, fosforilação oxidativa, cadeia transportadora de elétrons e parâmetros respiratórios .....	15
I.1.5. Papel da mitocôndria na homeostase do Ca <sup>2+</sup> .....	16
<b>I.2. OBJETIVOS</b> .....	19
I.2.1. Geral .....	19
I.2.2. Específicos .....	19
<b>PARTE II</b> .....	20
<b>II.1. METODOLOGIA</b> .....	21
II.1.1. Animais .....	21

II.1.2. Preparação da fração mitocondrial do coração .....	21
II.1.3. Preparação da cultura de cardiomiócitos .....	22
II.1.4. Descrição dos parâmetros da função mitocondrial na ausência de Ca <sup>2+</sup> .....	23
II.1.4.1. Avaliação dos parâmetros respiratórios .....	23
II.1.4.2. Medida da produção de ATP .....	24
II.1.4.3. Medida da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e da succinato desidrogenase (SDH) .....	24
II.1.4.4. Medida da produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	25
II.1.5. Descrição dos parâmetros da função mitocondrial na presença de Ca <sup>2+</sup> .....	25
II.1.5.1. Medida do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	25
II.1.5.2. Medida do inchamento mitocondrial .....	26
II.1.5.3. Medida do conteúdo de NAD(P)H mitocondrial .....	26
II.1.5.4. Medida da capacidade mitocondrial de retenção de Ca <sup>2+</sup> .....	26
II.1.6. Dosagem da concentração proteica .....	27
II.1.7. Análise estatística dos dados .....	27
<b>II.2. RESULTADOS</b> .....	28
II.2.1. Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens .....	28
II.2.2. Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre parâmetros respiratórios em cultura de cardiomiócitos permeabilizados .....	31



II.2.3. Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da succinato desidrogenase (SDH) em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens .....	33
II.2.4. Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre a produção de ATP em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens .....	35
II.2.5. Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens .....	36
II.2.6. Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre o inchamento em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens .....	37
II.2.7. Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens .....	38
II.2.8. Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre a capacidade de retenção de $Ca^{2+}$ em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens .....	40
II.2.9. Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens .....	41
<b>PARTE III</b> .....	42
<b>III.1. DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>III.2. CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>III.3. PERSPECTIVAS</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	57
<b>ANEXO I</b> .....	59

# **PARTE I**

## ***Introdução e Objetivos***

## RESUMO

O ácido fitânico (Fit) é um ácido graxo saturado de cadeia lateral ramificada, cujas concentrações estão aumentadas na doença de Refsum, uma desordem hereditária peroxissomal causada por deficiência na atividade da fitanoil-CoA hidroxilase. Os pacientes acometidos por essa doença apresentam como principais sintomas neuropatia periférica progressiva, ataxia cerebelar, retinite pigmentosa e cardiomiopatia, que pode levar a morte súbita. Embora os mecanismos responsáveis pelos danos teciduais ainda sejam pouco conhecidos, acredita-se que o aumento na concentração do Fit, que pode chegar a 5 mM no plasma dos pacientes, esteja associado à severidade da doença, indicando que este ácido graxo possa ser citotóxico. Estudos prévios demonstraram que o Fit altera a homeostase mitocondrial em cérebro e cerebelo, mas pouco tem se investigado sobre os efeitos desse ácido graxo sobre o coração, bem como sua relação com a patogênese da cardiomiopatia severa que acomete os pacientes. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos *in vitro* do Fit (10-30  $\mu\text{M}$ ) sobre a bioenergética mitocondrial e homeostase de íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) em preparações mitocondriais isoladas de coração de ratos jovens, bem como em cultura de cardiomiócitos. A respiração basal (estado 4), estimulada por adenosina 5-difosfato (ADP) (estado 3) e por carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona (CCCP) (estado desacoplado), bem como a razão de controle respiratório (RCR) e a produção de adenosina 5-trifosfato (ATP), foram inicialmente avaliadas. A variação de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi\text{m}$ ), o inchamento, o conteúdo dos dinucleotídeos de nicotinamida e adenina e de nicotinamida e adenina fosfato reduzidos (NAD(P)H) e a capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  foram também medidos na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . O Fit aumentou fortemente a respiração mitocondrial no estado 4 e diminuiu nos estados 3 e desacoplado, além de reduzir a RCR e a síntese de ATP, em mitocôndrias de coração. Além disso, o aumento do consumo de oxigênio no estado 4 causado pelo Fit também foi verificado em cardiomiócitos permeabilizados com digitonina. Esse ácido graxo também reduziu a  $\Delta\psi\text{m}$  e induziu o inchamento em mitocôndrias de coração suplementadas com  $\text{Ca}^{2+}$ , os quais foram prevenidos por ciclosporina A e ADP, indicando o envolvimento da abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial. Esses achados foram sustentados pelas observações de que o conteúdo de NAD(P)H e a capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  foram diminuídas pelo Fit na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os resultados indicam que o Fit altera a bioenergética mitocondrial e a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ ,

agindo como um forte desacoplador, inibidor metabólico e indutor do PTP. Portanto, presume-se que esses patomecanismos podem contribuir para a cardiomiopatia dos pacientes com a doença de Refsum.

## ABSTRACT

Phytanic acid (Phyt) is a branched-chain saturated fatty acid whose concentrations are increased in Refsum's disease, an inherited peroxisomal disorder caused by a deficiency in phytanoyl-CoA hydroxylase activity. Patients affected by this disease predominantly manifest with progressive peripheral neuropathy, cerebellar ataxia, retinitis pigmentosa and cardiomyopathy that can lead to sudden death. Although the mechanisms responsible for tissue damage are still poorly understood, it is believed that the increase in Phyt concentrations, which can reach 5 mM in the plasma of patients, is associated with the severity of the disease, indicating that this fatty acid may be cytotoxic. Previous studies have shown that Phyt alters mitochondrial homeostasis in the brain and cerebellum, but little has been investigated about the effects of this fatty acid on the heart, as well as its contribution to the pathogenesis of the severe cardiomyopathy that affects patients. Therefore, the present study investigated the *in vitro* effects of Phyt (10-30  $\mu$ M) on mitochondrial bioenergetics and calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) homeostasis in mitochondrial preparations isolated from rat heart, as well as in cultured cardiomyocytes. Resting (state 4), adenosine 5'-diphosphate (ADP)-stimulated (state 3) and carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP)-stimulated (uncoupled state) respirations, as well as the respiratory control ratio (RCR) and the adenosine 5'-triphosphate (ATP) production were initially evaluated. Mitochondrial membrane potential variation ( $\Delta\psi_m$ ), swelling, nicotinamide adenine and nicotinamide adenine phosphate dinucleotides reduced (NAD(P)H) content and  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity were also measured in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Phyt markedly increased mitochondrial respiration in state 4 and decreased in states 3 and uncoupled, besides reducing the RCR and ATP synthesis in heart mitochondria. Furthermore, the increase of oxygen consumption in state 4 caused by Phyt was verified in digitonin-permeabilized cardiomyocytes. This fatty acid also reduced the  $\Delta\psi_m$  and induced swelling in  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded heart mitochondria, which were prevented by cyclosporin A and ADP, implying the involvement of mitochondrial permeability transition (MPT) pore opening. These findings were supported by the observations that NAD(P)H content and  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity were decreased by Phyt in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . The data indicate that Phyt disrupts mitochondrial energy and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, acting as a strong

uncoupler, metabolic inhibitor and MPT inductor. It is presumed that these pathomechanisms may contribute to the cardiomyopathy of patients with Refsum's disease.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

$\Delta\Psi_m$  – variação de potencial de membrana mitocondrial

ADP – adenosina 5-difosfato

ANOVA – análise de variância

ANT – translocador de nucleotídeos de adenina

AT – atractilosídeo

ATP – adenosina 5-trifosfato

BSA – albumina bovina

$Ca^{2+}$  – cálcio

$CaCl_2$  – cloreto de cálcio

CCCP – carbonilcianeto-m-clorofenilhidrazona

$CO_2$  – dióxido de carbono

CsA – ciclosporina A

Cyp D – ciclofilina D

$FADH_2$  – dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido

EGTA – ácido etileno glicol-bis(2-aminoetiléter)-N, N, N', N'-tetra acético

EIM – erros inatos do metabolismo

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

GSH – glutatona reduzida

Fit – ácido fitânico

$H^+$  –próton

$H_2O_2$  – peróxido de hidrogênio

$HClO_4$  – ácido perclórico

HEPES – ácido 4-(2-hidroxiEtil)-1-piperazin etanol sulfônico

KCl – cloreto de potássio

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – fosfato de potássio monobásico

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  – fosfato de potássio dibásico

MCU – sistema uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$

$\text{Mg}^{2+}$  – magnésio

$\text{MgCl}_2$  – cloreto de magnésio

NADH – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NADPH – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato reduzido

NAD(P)H – dinucleotídeos de nicotinamida e adenina e de nicotinamida e adenina fosfato reduzidos

$\text{O}_2$  – oxigênio

PTP – poro de transição de permeabilidade

RCR – razão de controle respiratório

SDH – succinato desidrogenase

UA – unidades arbitrárias

UAF – unidades arbitrárias de fluorescência

UCPs – proteínas desacopladoras



## **I.1. INTRODUÇÃO**

### **I.1.1. Peroxissomos e doenças peroxissomais**

Os peroxissomos são organelas presentes em praticamente todas as células eucariotas. Na maioria das células humanas, sua presença pode variar de menos de cem a mais de mil peroxissomos por célula. Sua matriz granular contém mais de 50 enzimas que participam de vários processos metabólicos, incluindo  $\alpha$   $\beta$ -oxidação de certos ácidos graxos e também a biossíntese de fosfolípidios, ácidos biliares e compostos isoprenoides. Essa organela representa um dos principais locais na célula onde espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas e eliminadas (He et al., 2021).

Há um grupo de erros inatos do metabolismo (EIM) nos quais são observadas alterações peroxissomais. A incidência estimada dessas desordens é de 1:20.000 a 1:100.000 nascidos vivos, as quais estão divididas em dois grupos: a) defeitos com alteração em uma única proteína envolvida na  $\alpha$  ou  $\beta$ -oxidação e b) doenças hereditárias causadas por defeitos na biogênese peroxissomal. Os ácidos graxos fitânico (Fit) e pristânico se acumulam em diversas dessas doenças metabólicas hereditárias (Wanders et al., 2019; Waterham et al., 2016).

### **I.1.2. Metabolismo do ácido fitânico (Fit)**

O Fit é um ácido graxo saturado de cadeia lateral ramificada derivado da clorofila, que não é produzido no intestino humano, mas por microrganismos presentes no sistema gastrointestinal de ruminantes que metabolizam a clorofila, liberando fitol, que é então convertido em Fit (Allen et al., 2008). Esse ácido graxo também é proveniente da dieta, principalmente de carne e laticínios e, inicialmente, é captado pelo peroxissomo por meio

da proteína carreadora de esteróis 2. O metabolismo peroxissomal do Fit ocorre por  $\alpha$ -oxidação, principalmente nos rins e no fígado, onde atuam quatro enzimas que transformam o Fit em ácido pristânico (Figura 1), que é posteriormente degradado através de três ciclos da  $\beta$ -oxidação peroxissomal, seguido pela  $\beta$ -oxidação mitocondrial (Figura 2) (Wanders et al., 2001a; Wanders e Komen, 2007; Wierzbicki e Lloyd, 2007).

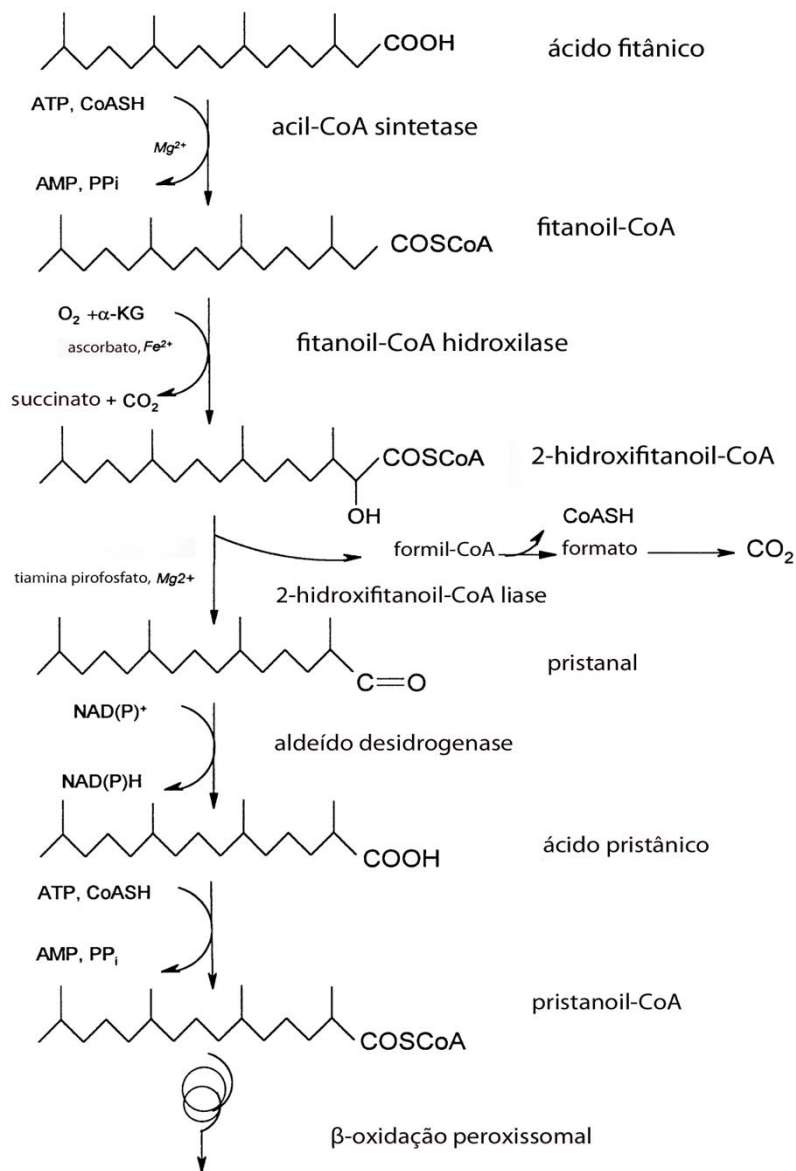


Figura 1.  $\alpha$ -oxidação peroxissomal. Adaptado de (Verhoeven e Jakobs, 2001).

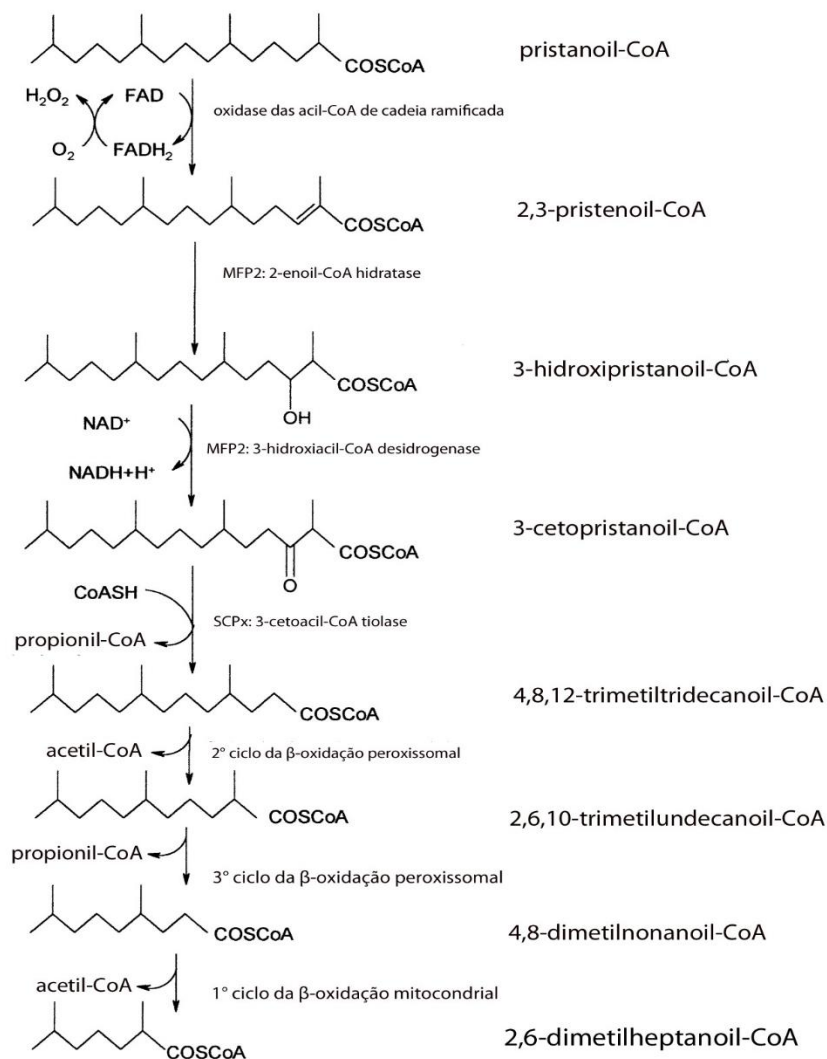


Figura 2.  $\beta$ -oxidação do ácido pristânico. Adaptado de (Verhoeven e Jakobs, 2001)

### I.1.3. Doença de Refsum

A doença de Refsum clássica ou adulta (MIM 266500) é uma desordem metabólica rara caracterizada por um defeito no gene estrutural que codifica a enzima fitanoil-CoA hidroxilase, levando ao acúmulo do Fit nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes. Essa enzima catalisa o primeiro passo da  $\alpha$ -oxidação peroxissomal, convertendo fitanoil-CoA em 2-hidroxi-fitanoil-CoA (Reiser et al, 2005; Wierzbicki e Lloyd, 2007). Quando ocorre um

bloqueio na atividade da enzima fitanoil-CoA hidroxilase, as concentrações plasmáticas de Fit nos pacientes podem atingir até 5000  $\mu\text{M}$  (níveis em indivíduos normais:  $< 30 \mu\text{M}$ ) (Al-Dirbashi et al., 2008; Wanders et al., 2003; Wierzbicki, 2007).

#### I.1.3.1 Achados Clínicos

Os pacientes afetados pela doença de Refsum clássica apresentam múltiplos sintomas clínicos, que geralmente começam a aparecer durante a infância. Os principais sinais clínicos são neurológicos, incluindo retinite pigmentosa, polineuropatia periférica e ataxia cerebelar. Além disso, destaca-se a cardiomiopatia associada à arritmia, alterações eletrocardiográficas, cardiomegalia e insuficiência cardíaca, que podem levar a morte súbita dos pacientes. Outros achados também incluem arritmias cardíacas, déficits auditivo e olfatório, ictiose, perda de visão, distúrbios psiquiátricos e proteinúria. Destaca-se que a grande maioria dos pacientes afetados apresenta sinais de retinite pigmentosa (degeneração da retina), sendo considerado o mais importante sintoma inicial da doença, precedendo até mesmo os achados bioquímicos característicos. Essa degeneração retinal característica parece ser devida ao acúmulo excessivo de Fit no tecido ocular. Exames patológicos revelam quase uma perda completa dos fotorreceptores, afinamento da camada nuclear interna e redução no número de células ganglionais da retina (Koh et al., 2001; Monnig et al., 2004; Wanders et al., 2001b; Weinstein, 1999; Wierzbicki, 2007; Wanders et al., 2019).

#### I.1.3.2 Diagnóstico

O diagnóstico da doença de Refsum deve ser realizado com base na análise das concentrações plasmáticas de Fit por cromatografia gasosa, além da medida da atividade da

enzima fitanoil-CoA hidroxilase, em fibroblastos, para confirmar o defeito no processo de  $\alpha$ -oxidação (Wanders et al., 2019).

#### I.1.3.3. Tratamento

Considerando que o Fit é obtido exclusivamente da dieta, proveniente principalmente de carne vermelha e laticínios, o tratamento é baseado na restrição dietética desse ácido graxo (Ferdinandusse et al., 2002). O primeiro paciente tratado com restrição dietética de Fit obteve a diminuição significativa nos níveis plasmáticos do metabólito, melhora significativa na polineuropatia, além da estabilização da retinite pigmentosa, indicando que o Fit é tóxico para células neurais (Wanders et al., 2001a). Muitos outros pacientes que foram submetidos a esse tratamento obtiveram diminuição nas concentrações de Fit (Wanders et al., 2019). Contudo, no início do tratamento os níveis de Fit podem aumentar, sugerindo que reservas teciduais são mobilizadas quando a ingesta é diminuída. Dessa forma, além da restrição de Fit na dieta, é indicado um rigoroso controle na ingesta calórica para evitar a mobilização excessiva de gordura que possa causar um aumento significativo nos níveis de Fit. Entretanto, deve-se destacar que o tratamento para a doença de Refsum ainda não é considerado efetivo, provavelmente porque a fisiopatogenia da doença é pouco conhecida.

#### I.1.3.4. Fisiopatologia

Os mecanismos fisiopatogênicos responsáveis pelas alterações cerebrais e cardíacas na doença de Refsum ainda não estão completamente esclarecidos, embora haja evidências apontando para uma ação tóxica do Fit particularmente sobre o tecido cerebral.

Estudos anteriores demonstraram que o Fit causa morte celular em astrócitos de hipocampo de rato cultivados, precedida por um aumento significativo na produção de ânion superóxido, despolarização mitocondrial e liberação do citocromo c (Kahlert et al., 2005). Foi demonstrado também que o Fit atua como desacoplador, inibe o translocador de nucleotídeos de adenina ADP / ATP (ANT) e o fluxo de elétrons em mitocôndrias e sinaptossomas de cérebro de ratos, bem como inibe a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase em córtex cerebral (Busanello et al., 2010; Kahlert et al., 2005; Komen et al., 2007; Schonfeld et al., 2004; Schonfeld e Reiser et al., 2006). Neste particular, também foi mostrado que este ácido facilita a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) em mitocôndrias de cérebro pré-tratadas com baixas quantidades de Ca<sup>2+</sup> (Shonfeld et al., 2004). Também foi demonstrado que o Fit induziu dano oxidativo e reduziu as defesas antioxidantes *in vitro* em córtex cerebral e cerebelo de ratos (Leipnitz et al., 2010; Ronicke et al., 2009), bem como uma injeção intracerebelar desse ácido graxo provocou desequilíbrio redox mediado por espécies reativas de nitrogênio (ERN) e astrogliose em cerebelo de ratos (Borges et al., 2015).

Tais resultados indicam que alterações na homeostase energética mitocondrial e produção aumentada de espécies reativas são importantes mecanismos responsáveis pela toxicidade do Fit em células cerebrais. No entanto, no que diz respeito aos efeitos do Fit em coração, uma quantidade significativamente menor de trabalhos foi realizada, sendo verificado que esse ácido graxo atua como desacoplador da fosforilação oxidativa, inibidor do complexo I-III e induz a produção de ERO em coração (Grings et al., 2012; Schonfeld e Reiser et al., 2006). Sendo assim, os mecanismos bioquímicos responsáveis pelos efeitos deletérios do Fit, especialmente sobre o coração, ainda precisam ser melhor estudados.

#### **I.1.4. Ciclo do ácido cítrico, fosforilação oxidativa, cadeia transportadora de elétrons e parâmetros respiratórios**

O acetil-CoA proveniente da oxidação de carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos e corpos cetônicos pode ser completamente oxidado no ciclo do ácido cítrico a  $\text{CO}_2$ , fornecendo as coenzimas reduzidas NADH e  $\text{FADH}_2$ , que são transportadores de elétrons para os complexos I e II, respectivamente, da cadeia respiratória mitocondrial. O fluxo de elétrons através dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória, tendo o  $\text{O}_2$  como acceptor final dos elétrons provenientes do complexo IV, é acompanhado pelo bombeamento de  $\text{H}^+$  da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, através dos complexos I, III e IV, gerando um acúmulo desse íon e, por consequência, formando um gradiente eletroquímico. Em sequência, a ATP sintase (complexo V) abre um canal na porção  $F_o$  capaz de dissipar os  $\text{H}^+$  de volta para a matriz mitocondrial, utilizando então a energia liberada para realizar a fosforilação do ADP em ATP (Nicholls e Ferguson, 2013; Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017).

A respiração mitocondrial pode ser estimada através da medida do consumo de  $\text{O}_2$ , sendo um excelente sensor da atividade da cadeia respiratória mitocondrial e da oxidação de substratos no ciclo do ácido cítrico, uma vez que os processos de transferência de elétrons, bombeamento de  $\text{H}^+$ , formação do gradiente eletroquímico e síntese de ATP, são acoplados e estão interligados ao consumo de  $\text{O}_2$ . Experimentalmente, pode-se dividir a respiração mitocondrial em estados respiratórios, sendo que o estado 3 representa o consumo de  $\text{O}_2$  quando as mitocôndrias, em um meio contendo substrato oxidável capaz de estimular o fornecimento de elétrons para a cadeia respiratória, são expostas ao ADP, estimulando o consumo de  $\text{O}_2$  e produzindo ATP (estado fosforilante). O estado 4 geralmente é estimulado

por oligomicina, um inibidor da ATP sintase, refletindo o consumo de  $O_2$  necessário para a formação e manutenção do gradiente eletroquímico, reduzindo a taxa da respiração (estado não-fosforilante). Ainda, é possível utilizar compostos desacopladores da fosforilação oxidativa, os quais provocam um vazamento de  $H^+$  do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, acelerando a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e o consumo de  $O_2$  sem produção de ATP (estado desacoplado) (Nicholls e Ferguson, 2013; Nicholls, 2021).

É possível medir experimentalmente, além da respiração mitocondrial, a variação de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), o inchamento, a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a capacidade de retenção de  $Ca^{2+}$  e o conteúdo de NAD(P)H em mitocôndrias, dentre outros parâmetros (Maciel et al., 2004; Saito e Castilho, 2010).

### **I.1.5. Papel da mitocôndria na homeostase do $Ca^{2+}$**

Uma função crucial desempenhada por mitocôndrias é manter a homeostase celular de  $Ca^{2+}$ , que é responsável por sinalizar e controlar uma série de eventos intracelulares. Essa organela tem a capacidade, quando íntegra e funcional, de captar o  $Ca^{2+}$  presente no citosol ou liberar seu estoque para a célula, mantendo a concentração intracelular desse cátion em condições ótimas para o funcionamento celular (Figueira et al., 2013; Garbincius e Elrod, 2022; Rizzuto et al., 2012). A proteína responsável pela captação mitocondrial do  $Ca^{2+}$  foi recentemente elucidada, sendo um sistema uniporte de captação de  $Ca^{2+}$  (MCU) (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011; Marchi e Pinton, 2014; Pan et al., 2013; Pendin et al., 2014). Por outro lado, a liberação de  $Ca^{2+}$  para a matriz é realizada pelos trocadores  $Na^+/Ca^{2+}$  (mNCX) e  $H^+/Ca^{2+}$  (mHCX) (Bernardi e Von Stockum, 2012; Rizzuto et al., 2012).



Quando a célula está sob condições de uma sobrecarga citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  que pode ser muito prejudicial para o funcionamento celular, a capacidade da mitocôndria de captar e reter  $\text{Ca}^{2+}$  contribui para o tamponamento do excesso citosólico desse cátion (Figueira et al., 2013; Rizzuto et al., 2012). Por outro lado, uma elevada captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ , além da sua capacidade de retenção, pode levar a uma condição conhecida como transição de permeabilidade, resultado da abertura de um poro na membrana mitocondrial interna (Bernardi et al., 2021; Vercesi et al., 2018). O PTP mitocondrial é formado por proteínas com identidades ainda não totalmente elucidadas, apesar de já ser reconhecido o papel da ciclofilina D (Cyp D) como um componente chave para a abertura do PTP (Baines et al., 2005; Bernardi, 2013).

A permanente abertura do PTP resulta em consequências drásticas para a célula, tais como a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol, inchamento mitocondrial, liberação de fatores apoptogênicos intramitocondriais como o citocromo c (Liu et al., 1996), despolarização mitocondrial, perda de íons e metabólitos, tais quais:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , GSH, NADH e NADPH, comprometimento da síntese de ATP e morte celular (apoptose e necrose) (Bernardi e Von Stockum, 2012; Rasola e Bernardi, 2011; Rizzuto et al., 2012; Vercesi et al., 2018). Muitos trabalhos *in vitro* e *in vivo* tem associado a indução do PTP com uma disfunção mitocondrial na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , demonstrando alteração nos parâmetros da homeostase bioenergética mitocondrial (Cecatto et al., 2014; Cecatto et al., 2018; Maciel et al., 2004; Mirandola et al., 2010; Tonin et al., 2014). Além disso, o ataque oxidativo por ERO está descrito como um importante mecanismo potencializador da abertura do PTP (Adam-Vizi e Starkov, 2010; Kowaltowski et al., 2001). Neste contexto, altas concentrações de NADH previnem a abertura do PTP, por promover a redução do  $\text{NADP}^+$  catalisada pela transidrogenase

mitochondrial e, conseqüentemente, melhoram a capacidade redox da mitocôndria (Hoek e Rydstrom, 1988; Lehninger et al., 1978; Zago et al., 2000).

## **I.2. OBJETIVOS**

### **I.2.1. Geral**

Considerando que pacientes com a doença de Refsum acumulam, predominantemente, Fit nos líquidos biológicos e desenvolvem frequentemente cardiomiopatia severa que pode resultar em morte súbita de patogênese ainda desconhecida, o presente estudo avaliou os efeitos *in vitro* do Fit sobre a bioenergética mitocondrial e homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  em preparações mitocondriais obtidas de coração de ratos, bem como em cultura de cardiomiócitos.

### **I.2.2. Específicos**

- 1) Analisar os parâmetros respiratórios (estado 3, estado 4, estado desacoplado e razão de controle respiratório), a produção de ATP, a atividade de complexos da cadeia respiratória mitocondrial e da succinato desidrogenase (SDH) e a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens e cultura de cardiomiócitos, na presença do Fit em diferentes concentrações e na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- 2) Averiguar a  $\Delta\Psi_m$ , o inchamento mitocondrial, o conteúdo de NAD(P)H e a capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens, suplementadas com  $\text{Ca}^{2+}$  exógeno e na presença do Fit em diferentes concentrações.

## **PARTE II**

### ***Metodologia e Resultados***

## **II.1. METODOLOGIA**

### **II.1.1. Animais**

Foram utilizados 96 ratos Wistar machos com 30 dias de vida oriundos do biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, criados e mantidos em padrão sanitário convencional, com fotoperíodo de 12 h claro/escuro (7h/19h) e temperatura controlada ( $21\pm 1$  °C). Nessa idade, os tecidos dos animais possuem a bioquímica tecidual bem estabelecida, o que permite uma avaliação *in vitro* mais precisa dos parâmetros da função mitocondrial propostos neste trabalho. Os animais foram mantidos em gaiolas com dimensões 41 x 34 x 16 cm (máximo 5 animais/caixa), devidamente identificadas, em cama de maravalha de pinus selecionada e autoclavada, e alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab CR-1® - Nuvital) e água *ad libitum*. As gaiolas foram substituídas por outras com altura mínima de 17,8 cm assim que possível. A troca da cama dos ratos foi realizada pelos funcionários dos biotérios duas vezes por semana. O consumo de água e ração foi verificado diariamente, sendo feita a manutenção das mamadeiras e comedouro três vezes por semana. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFRGS (nº 39538) (Anexo I).

### **II.1.2. Preparação da fração mitocondrial do coração**

Para o isolamento da fração mitocondrial, os animais foram previamente anestesiados com isoflurano por via inalatória. Para tanto, os mesmos foram colocados numa caixa transparente hermeticamente fechada, com um algodão embebido em isoflurano, e, após anestesiados, foram mortos por decapitação. Posteriormente, o coração foi removido e

homogeneizado em um tampão específico com EGTA e as mitocôndrias foram isoladas como previamente descrito por Ferranti e colaboradores (2003). O sedimento contendo mitocôndrias purificadas foi ressuspenso em 350  $\mu$ L de tampão sem EGTA, em uma concentração proteica final de aproximadamente 10-15 mg/mL, que foram incubadas a 37 °C na ausência (grupo controle) ou presença do Fit (10-30  $\mu$ M), para a avaliação dos parâmetros bioquímicos. As mitocôndrias foram utilizadas para as técnicas bioquímicas no mesmo dia em que foram preparadas, com exceção das medidas das atividades dos complexos da cadeia respiratória e da SDH em que se faz necessário congelar e descongelar 3 vezes as amostras antes dos ensaios.

### **II.1.3. Preparação da cultura de cardiomiócitos**

Cultura de cardiomiócitos (H9c2 - *embryonic rat heart-derived ventricular cells*) (Kuznetson et al., 2015) permeabilizadas com digitonina (8  $\mu$ M) também foram utilizados para a avaliação dos parâmetros respiratórios. As células cresceram e foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % CO<sub>2</sub> e 95 % de ar em DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10 % de soro bovino fetal. Os meios de cultura foram trocados três vezes por semana. As culturas foram reestabelecidas a cada três meses preparadas de estoques de células congeladas. Antes dos experimentos, a morfologia das culturas foi verificada e as células contadas para as análises.

## II.1.4. Descrição dos parâmetros da função mitocondrial na ausência de $\text{Ca}^{2+}$

### II.1.4.1. Avaliação dos parâmetros respiratórios

Os parâmetros respiratórios estado 3, estado 4, estado desacoplado e a razão de controle respiratório (RCR) foram medidos pelo consumo de  $\text{O}_2$  num Oxígrafo-2k OROBOROS (Innsbruck, Áustria) a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , utilizando como substratos glutamato mais malato (2,5 mM cada) ou succinato (5 mM) na presença de rotenona (0,5  $\mu\text{M}$  inibidor do complexo I). Esses experimentos foram realizados em meio de incubação MIR05 contendo preparações mitocondriais obtidas de coração de ratos (0,1 mg de proteína/mL) na presença do Fit (10-30  $\mu\text{M}$ ). Os estados 3, 4 e desacoplado foram estimulados pela adição de ADP (1 mM), oligomicina (1  $\mu\text{g/mL}$ , inibidor da ATP sintase) e CCCP (dois pulsos de 0,5  $\mu\text{M}$ , desacoplador – que foram suficientes para atingir a respiração máxima), respectivamente. A RCR foi obtida pela razão entre os estados 3 e 4 (Amaral et al., 2016).

Além disso, avaliou-se os parâmetros respiratórios em cardiomiócitos (1,5 milhão de células/mL) permeabilizados com digitonina, utilizando o protocolo SUIIT (*substrate-uncoupler inhibitor titration*) em meio de incubação MIR05. Esse protocolo consiste no uso de substratos ligados ao complexo I (5 mM piruvato mais 0,5 mM malato mais 10 mM glutamato) e ao complexo II (10 mM succinato), bem como de ADP (1 mM) para estimular o estado 3, oligomicina (1  $\mu\text{g/mL}$ , inibidor da ATP sintase) para estimular o estado 4 e CCCP (dois pulsos de 0,5  $\mu\text{M}$ , desacoplador – que foram suficientes para atingir a respiração máxima) para estimular o estado desacoplado, além de rotenona (0,5  $\mu\text{M}$  inibidor do complexo I) para se obter a respiração independente dos substratos ligados ao complexo I e antimicina A (2,5  $\mu\text{M}$  inibidor do complexo III) para se determinar a respiração não-

mitocondrial (Makrecka-Kuka et al., 2015).

#### II.1.4.2 Medida da produção de ATP

O ensaio foi realizado com preparações mitocondriais de coração (0,1 mg/mL de proteína) no meio de incubação para a avaliação dos parâmetros respiratórios, utilizando glutamato mais malato como substratos (2,5 mM cada), em um volume final de 500  $\mu$ L. O Fit (10-30  $\mu$ M) foi adicionado ao meio de incubação e a reação foi parada após a adição de HClO<sub>4</sub> gelado (6 M). Em seguida, a suspensão mitocondrial foi submetida a uma centrifugação a 21.000 g por 5 minutos a 4°C. Um volume de 400  $\mu$ L do sobrenadante foi neutralizado com 100  $\mu$ L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 M) e submetido a uma nova centrifugação a 21.000 g por 5 minutos a 4°C. O ATP foi determinado no sobrenadante pela sonda luciferina-luciferase, conforme instruções do fabricante. A luminescência foi medida em um espectrofotômetro de microplacas Spectramax M5. Oligomicina A (1  $\mu$ g . mL<sup>-1</sup>) foi usada como controle positivo (Cecatto et al., 2018).

#### II.1.4.3. Medida da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e da succinato desidrogenase (SDH)

Foram avaliadas as atividades do complexo I (Brunmair et al., 2004), complexo II e II-III (Fischer et al., 1985) e complexo IV (Rustin et al., 1994) da cadeia respiratória mitocondrial, bem como da SDH (Fischer et al., 1985), utilizando preparações mitocondriais de coração de ratos e determinadas em espectrofluorímetro para microplacas Spectramax M5 a 37 °C.



#### II.1.4.4. Medida da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada de acordo com o método de Mohanty e colaboradores (1997), através da medida da oxidação do Ampliflu Red 5 μM, na presença de 0,5 units. mL<sup>-1</sup> de peroxidase, em espectrofluorímetro Hitachi F-2500 operado em comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 e 587 nm, respectivamente, na temperatura de 37 °C. As preparações mitocondriais obtidas de coração de ratos (0,35 mg de proteína/mL) foram adicionadas ao meio de incubação contendo 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg . mL<sup>-1</sup> BSA, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 μg . mL<sup>-1</sup> oligomicina A, 30 μM EGTA e 5 mM HEPES, pH 7.2, e glutamato mais malato (2,5 mM cada) como substratos.

#### **II.1.5. Descrição dos parâmetros da função mitocondrial na presença de Ca<sup>2+</sup>**

Nestes experimentos, CaCl<sub>2</sub> foi adicionado aos ensaios e os parâmetros foram avaliados num espectrofluorímetro Hitachi F-2500 a 37 °C. Os parâmetros foram realizados em meio de incubação contendo 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg . mL<sup>-1</sup> BSA, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 μg . mL<sup>-1</sup> oligomicina A, 30 μM EGTA e 5 mM HEPES, pH 7.2, e glutamato mais malato (2,5 mM cada) como substratos, utilizando-se preparações mitocondriais obtidas de coração de ratos (0,35 mg de proteína/mL) na presença do Fit (10-30 μM).

##### II.1.5.1. Medida da variação de potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ<sub>m</sub>)

A medida da ΔΨ<sub>m</sub> foi realizada num espectrofluorímetro Hitachi F-2500 avaliando a fluorescência do corante catiônico safranina O (5 μM) em comprimento de onda de excitação e emissão de 495 e 586 nm, respectivamente, na temperatura de 37 °C (Akerman e Wikstrom, 1976). CaCl<sub>2</sub> (30 μM) foi adicionado 150 s após o início do ensaio. A quantificação dos

resultados foi realizada pela medida da variação de unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) entre 150 e 250 segundos após o início dos ensaios.

#### II.1.5.2. Medida do inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi avaliado num espectrofotômetro de microplacas Spectramax M5 medindo-se o espalhamento de luz a 540 nm na temperatura de 37 °C (Maciel et al., 2004).  $\text{CaCl}_2$  (50  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado 150 s após o início do ensaio. A quantificação dos resultados foi realizada pela medida da variação de unidades arbitrárias (UA) entre 150 e 250 segundos após o início dos ensaios.

#### II.1.5.3. Medida do conteúdo de NAD(P)H mitocondrial

O conteúdo de NAD(P)H na matriz mitocondrial foi determinado num espectrofluorímetro Hitachi F-2500 avaliando a autofluorescência do NAD(P)H em comprimento de onda de excitação e emissão de 340 e 450 nm, respectivamente, na temperatura de 37 °C (Maciel et al., 2004).  $\text{CaCl}_2$  (30  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado 150 s após o início da medida. A quantificação dos resultados foi realizada pela medida da variação de UAF entre 150 e 250 segundos após o início dos ensaios.

#### II.1.5.4. Medida da capacidade mitocondrial de retenção de $\text{Ca}^{2+}$

A capacidade mitocondrial de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  foi determinada num espectrofluorímetro Hitachi F-2500 em comprimento de onda de excitação e emissão de 506 e 532 nm, respectivamente, na temperatura de 37 °C, medindo-se a fluorescência do Calcium

Green-5N que representa as concentrações extramitocondriais de  $\text{Ca}^{2+}$  livre (Saito e Castilho, 2010).  $\text{CaCl}_2$  (30  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado 150 s após o início da medida.

### **II.1.6. Dosagem da concentração proteica**

As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry, utilizando-se albumina bovina como padrão (Lowry et al., 1951).

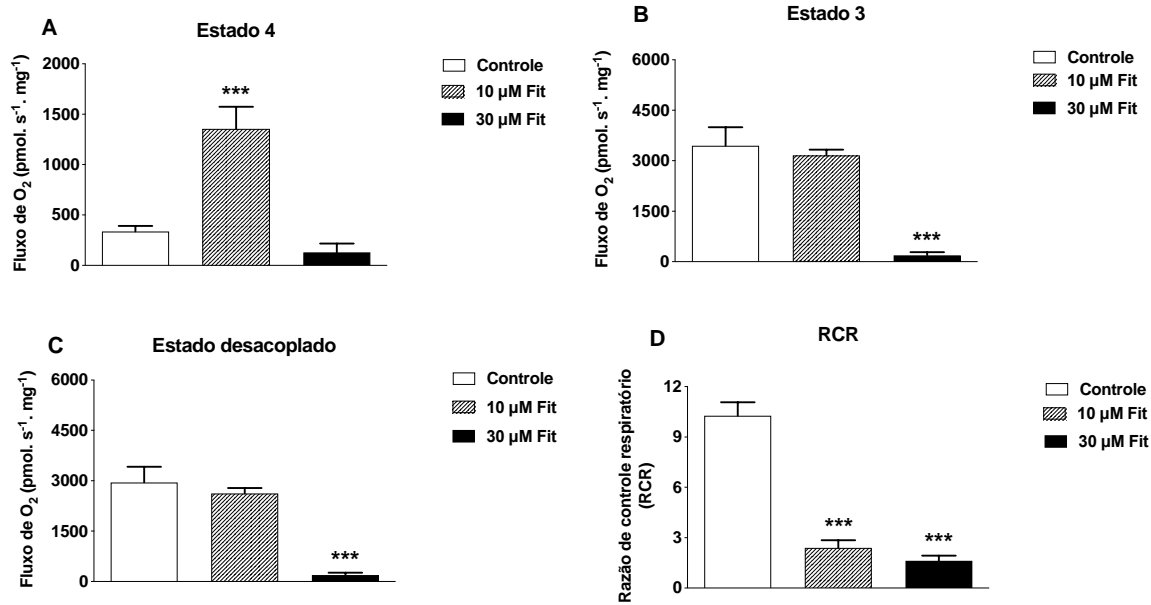
### **II.1.7. Análise estatística dos dados**

A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey quando comparadas duas ou mais médias, e teste *t* de Student quando comparadas duas médias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e as diferenças consideradas significativas quando o  $P < 0.05$ . As análises estatísticas foram feitas em um computador PC compatível pelo programa GraphPad Prism 9.0.

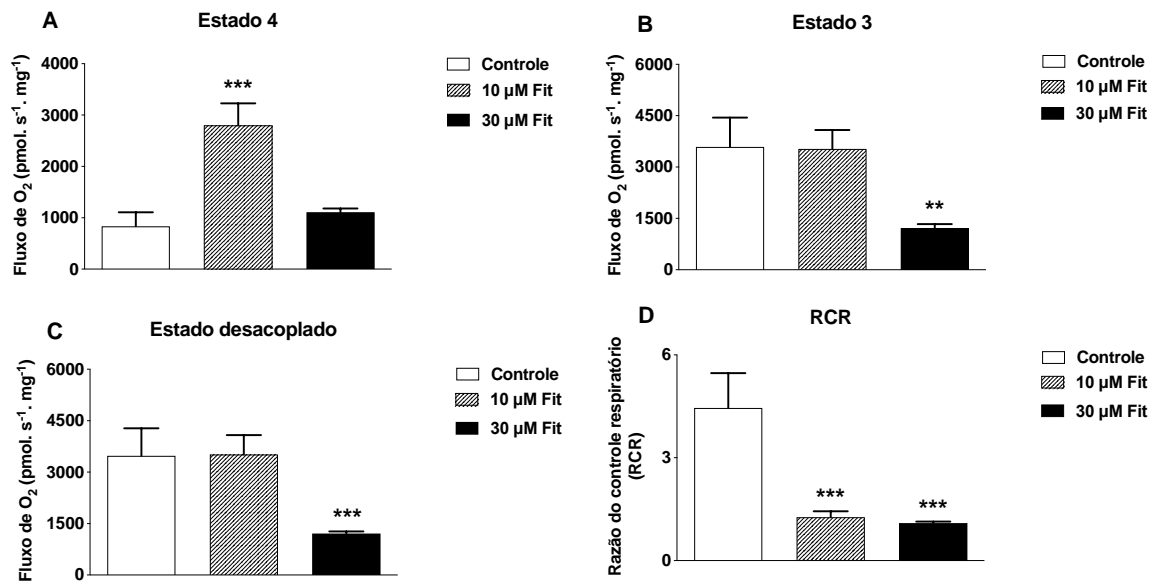
## II.2. RESULTADOS

### II.2.1. Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre parâmetros respiratórios em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens

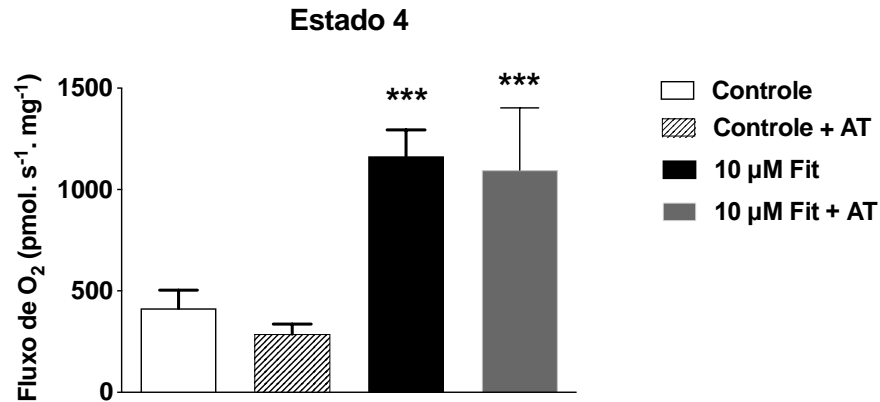
As figuras 3 e 4 mostram o efeito do Fit sobre parâmetros respiratórios, utilizando glutamato mais malato e succinato como substratos respiratórios em preparações mitocondriais de coração de ratos, respectivamente. Pode-se observar que o Fit aumentou significativamente o consumo de O<sub>2</sub> no estado 4 (10 µM) e diminuiu a RCR (10-30 µM), quando utilizado glutamato mais malato [Fig. 3A:  $F_{(2,9)}=85,23$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 3D:  $F_{(2,9)}=288,4$ ,  $P < 0,001$ ] ou succinato [Fig. 4A:  $F_{(2,8)}=46,71$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 4D:  $F_{(2,8)}=43,76$ ,  $P < 0,001$ ] como substratos, indicando efeito desacoplador em baixa concentração (10 µM). Além disso, o Fit (30 µM) foi capaz de reduzir fortemente os estados 3 e desacoplado em mitocôndrias de coração com glutamato mais malato [Fig. 3B:  $F_{(2,9)}=113,8$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 3C:  $F_{(2,9)}=109,3$ ,  $P < 0,001$ ] ou succinato [Fig. 4B:  $F_{(2,8)}=22,80$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 4C:  $F_{(2,8)}=23,70$ ,  $P < 0,001$ ], indicando que o Fit atua como inibidor metabólico em concentrações mais elevadas (30 µM). Finalmente, observa-se na figura 5 [ $F_{(3,12)}=27,5$ ,  $P < 0,001$ ] que o atractilosídeo (AT), que é um inibidor do ANT, não alterou o aumento do estado 4 induzido pelo Fit em mitocôndrias de coração, indicando que esse transportador não está envolvido no efeito desacoplador provocado pelo Fit.



**Figura 3.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre o estado 4 (A), o estado 3 (B), o estado desacoplado (C) e a razão de controle respiratório (RCR) (D) em mitocôndrias de coração. O Fit (10 - 30  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado ao meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,1 mg proteína.  $\text{mL}^{-1}$ ) e glutamato (2,5 mM) mais malato (2,5 mM) como substratos no início dos ensaios. Os controles foram realizados na ausência de Fit. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 4 experimentos independentes (N) e os estados 3, 4 e desacoplado estão expressos como  $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ . Análise de variância de uma via (ANOVA) está descrita no texto. \*\*\* $P < 0,001$ , comparados ao controle (teste de Tukey).



**Figura 4.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre o estado 4 (A), o estado 3 (B), o estado desacoplado (C) e a razão de controle respiratório (RCR) (D) em mitocôndrias de coração. O Fit (10 - 30 μM) foi adicionado ao meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,1 mg proteína. mL<sup>-1</sup>) e succinato (5 mM) como substratos no início dos ensaios. Os controles foram realizados na ausência de Fit. Os valores representam média ± desvio padrão de 3 a 4 experimentos independentes (N) e os estados 3, 4 e desacoplado estão expressos como pmol O<sub>2</sub>. s<sup>-1</sup>. mg proteína<sup>-1</sup>. Análise de variância de uma via (ANOVA) está descrita no texto. \*\**P*<0,01, \*\*\**P*<0,001, comparados ao controle (teste de Tukey).

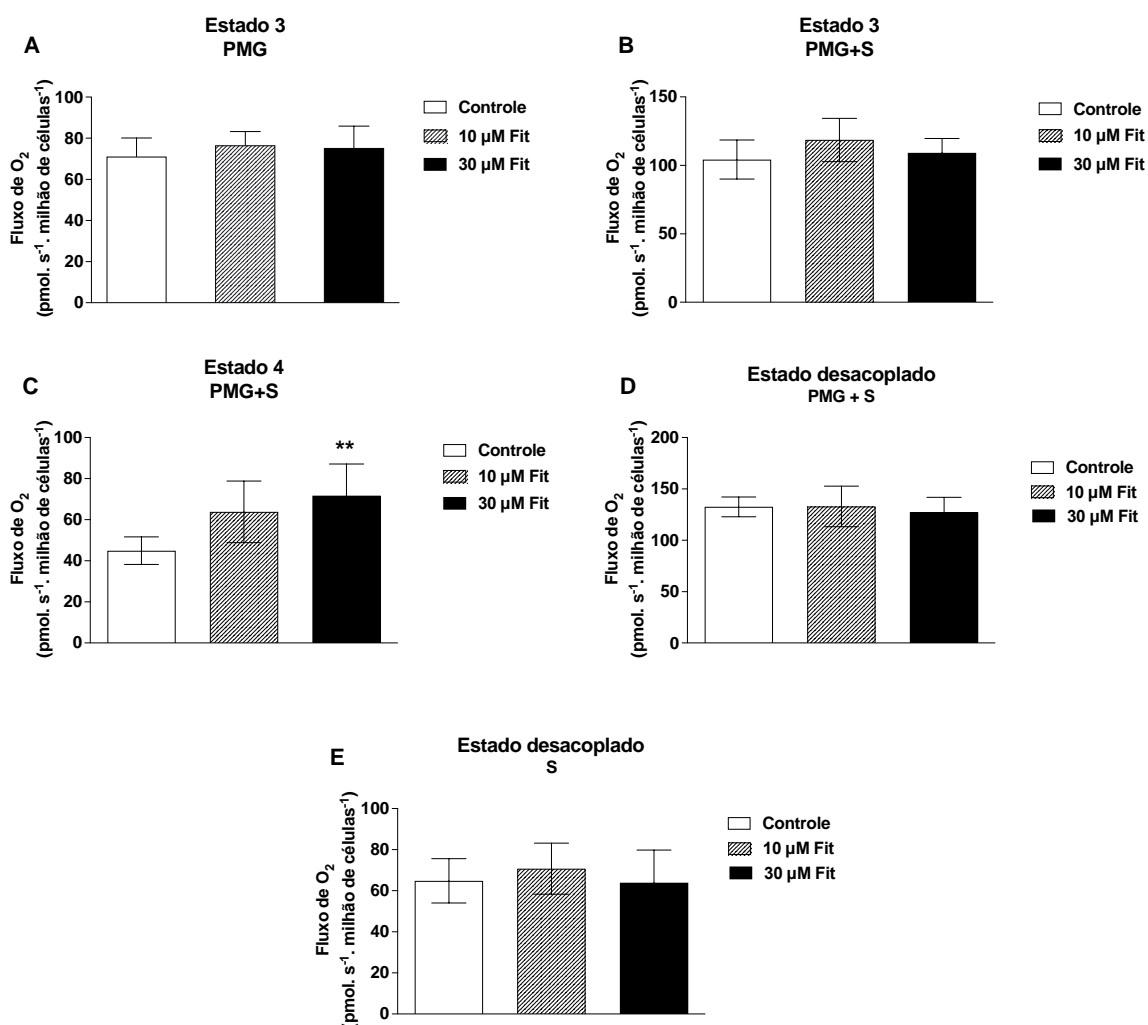


**Figura 5.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre o estado 4 na presença de atractilosídeo (AT, 30 µM) em mitocôndrias de coração. O Fit (10 - 30 µM) foi adicionado ao meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,1 mg proteína. mL<sup>-1</sup>) e glutamato (2,5 mM) mais malato (2,5 mM) como substratos no início dos ensaios. Os controles foram realizados na ausência de Fit. Os valores representam média ± desvio padrão de 4 experimentos independentes (N) e estão expressos como pmol O<sub>2</sub>. s<sup>-1</sup>. mg proteína<sup>-1</sup>. Análise de variância de uma via (ANOVA) está descrita no texto. \*\*\**P*<0,001, comparados ao controle (teste de Tukey).

### **II.2.2. Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre parâmetros respiratórios em cultura de cardiomiócitos permeabilizados**

A figura 6 mostra o efeito do Fit (10-30 µM) sobre os parâmetros respiratórios em cardiomiócitos permeabilizados com digitonina (8 µM), no intuito de avaliar a funcionalidade mitocondrial integrada ao ambiente citosólico, utilizando o protocolo SUIT que permite testar de forma sequencial diferentes substratos e vários estados respiratórios (Makrecka-Kuka et al., 2015). Verificou-se que o Fit foi capaz de aumentar significativamente o consumo de O<sub>2</sub> no estado 4 [Fig. 6C:  $F_{(2,15)}=6,744$ ,  $P < 0,01$ ], embora

não tenha alterado os estados 3 e desacoplado, quando os cardiomiócitos respiraram com substratos ligados ao NADH (piruvato mais malato mais glutamato) ou ao FADH<sub>2</sub> (succinato).



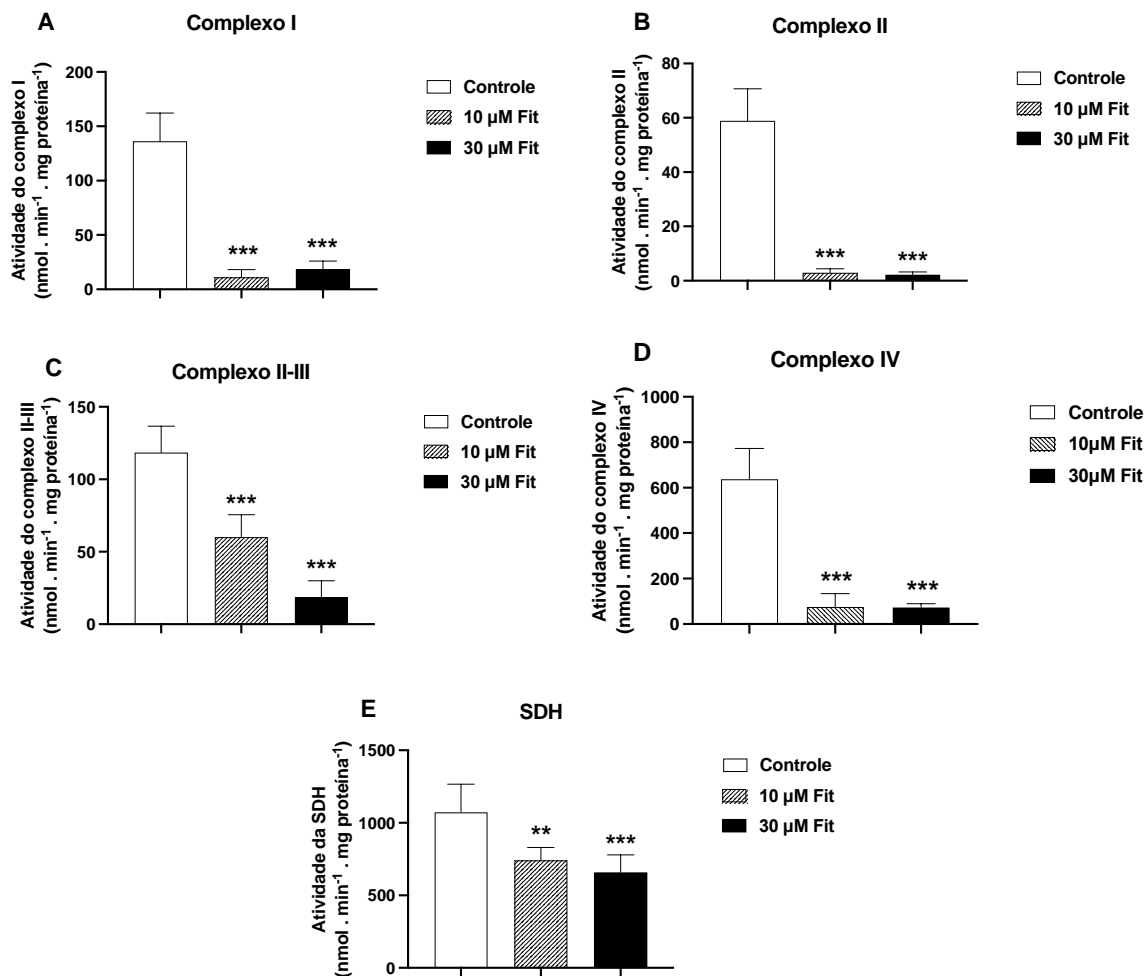
**Figura 6.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre parâmetros respiratórios em cultura de cardiomiócitos permeabilizados. Foram avaliados o estado 3 (A e B), estado 4 (C) e estado desacoplado (D e E), utilizando uma combinação de substratos ligados ao NADH (5 mM piruvato mais 0,5 mM malato mais 10 mM glutamato - PMG) e FADH<sub>2</sub> (10 mM succinato – S). O Fit (10 - 30 μM) foi adicionado ao meio de incubação contendo os cardiomiócitos



permeabilizados (1,5 milhão de células . mL<sup>-1</sup>). Os controles foram realizados na ausência de Fit. Os valores representam média ± desvio padrão de 5 a 9 experimentos independentes (N) e estão expressos como pmol O<sub>2</sub>. s<sup>-1</sup>. milhão de células<sup>-1</sup>. Análise de variância de uma via (ANOVA) está descrita no texto. \*\**P*<0,01 comparados ao controle (teste de Tukey).

### **II.2.3. Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre a atividade dos complexos da cadeia respiratória e da succinato desidrogenase (SDH) em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens**

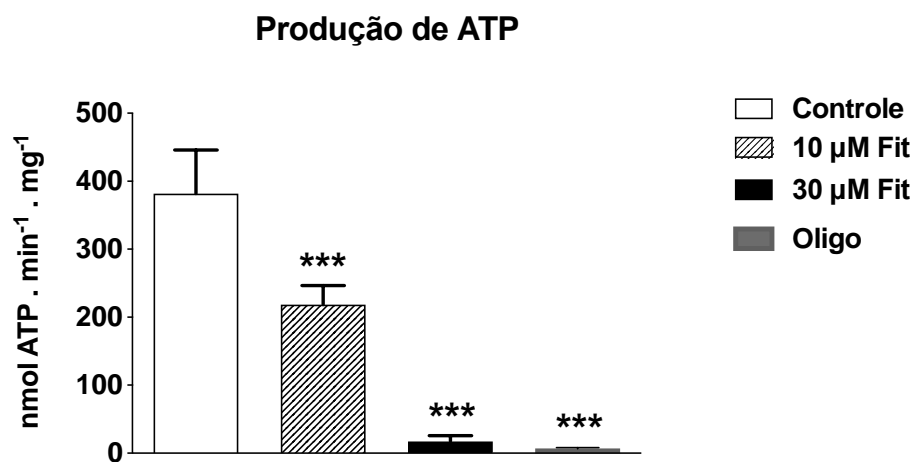
Considerando que o Fit reduziu significativamente a respiração mitocondrial nos estados 3 e desacoplado em preparações mitocondriais de coração de ratos, avaliou-se posteriormente o efeito do Fit (10-30 µM) sobre a atividade dos complexos I-IV da cadeia respiratória mitocondrial e da SDH (Figura 7). Pode-se observar na figura que o Fit inibiu fortemente a atividade de todos os complexos da cadeia respiratória, bem como da SDH [Fig. 7A:  $F_{(2,12)}=85,83$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 7B:  $F_{(2,15)}=134,8$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 7C:  $F_{(2,15)}=64,48$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 7D:  $F_{(2,12)}=64,36$ ,  $P < 0,001$ ; Fig. 7E:  $F_{(2,15)}=14,49$ ,  $P < 0,001$ ], o que pode possivelmente estar relacionado ao efeito de inibição metabólica (inibição dos estados 3 e desacoplado) provocado por esse ácido graxo.



**Figura 7.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre o complexo I (A), II (B), II-III (C), IV (D) e succinato desidrogenase (SDH) (E) em mitocôndrias de coração. O Fit (10 - 30  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado ao meio de incubação e pré-incubado por 30 min. Os controles foram realizados na ausência de Fit. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 experimentos independentes (N) e estão expressos como  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$ . Análise de variância de uma via (ANOVA) está descrita no texto. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , comparados ao controle (teste de Tukey).

#### II.2.4. Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre a produção de ATP em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens

Com o objetivo de avaliar se os efeitos do Fit (10-30  $\mu\text{M}$ ) sobre a respiração mitocondrial resulta num déficit energético, investigou-se seu efeito sobre a produção de ATP em preparações mitocondriais de coração, utilizando glutamato mais malato como substratos. A figura 8 mostra que o Fit diminuiu significativamente a produção de ATP [ $F_{(3,16)}=130,0$ ,  $P < 0,001$ ], confirmando que o efeito desacoplador e inibidor metabólico do Fit resulta num forte prejuízo na produção de energia.

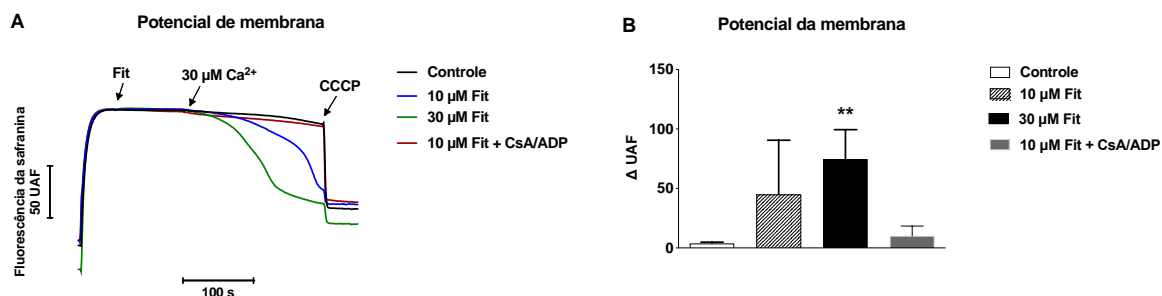


**Figura 8.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre a produção de ATP em mitocôndrias de coração. O Fit (10 - 30  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado ao meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,1 mg proteína.  $\text{mL}^{-1}$ ) e glutamato (2,5 mM) mais malato (2,5 mM) como substratos no início dos ensaios. Os controles foram realizados na ausência de Fit. Oligomicina A (Oligo, 1  $\mu\text{g}$ .  $\text{mL}^{-1}$ ) foi utilizada como controle positivo. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 5 experimentos independentes (N) e estão expressos

como  $\text{nmol ATP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prote\u00edna}^{-1}$ . An\u00e1lise de vari\u00e2ncia de uma via (ANOVA) est\u00e1 descrita no texto. \*\*\* $P < 0,001$ , comparados ao controle (teste de Tukey).

### II.2.5. Efeito *in vitro* do \u00e1cido fit\u00e2nico (Fit) sobre a varia\u00e7\u00e3o do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em prepara\u00e7\u00f5es mitocondriais de cora\u00e7\u00e3o de ratos jovens

No intuito de investigar os efeitos do Fit (10-30  $\mu\text{M}$ ) sobre outras fun\u00e7\u00f5es mitocondriais card\u00edacas, o pr\u00f3ximo passo foi avaliar a  $\Delta\Psi_m$ , utilizando glutamato mais malato e na presen\u00e7a de  $\text{Ca}^{2+}$  ex\u00f3geno (30  $\mu\text{M}$ ), em prepara\u00e7\u00f5es mitocondriais de cora\u00e7\u00e3o de ratos. Pode-se observar na figura 9 que o Fit diminuiu a  $\Delta\Psi_m$  ap\u00f3s a adi\u00e7\u00e3o de  $\text{Ca}^{2+}$ , que foi totalmente prevenido pela presen\u00e7a de CsA mais ADP (painel A), indicando que o efeito foi desencadeado pela abertura do PTP mitocondrial. A quantifica\u00e7\u00e3o dos resultados est\u00e1 apresentada no painel B [ $F_{(3,11)}=7,582$ ,  $P = 0,01$ ].

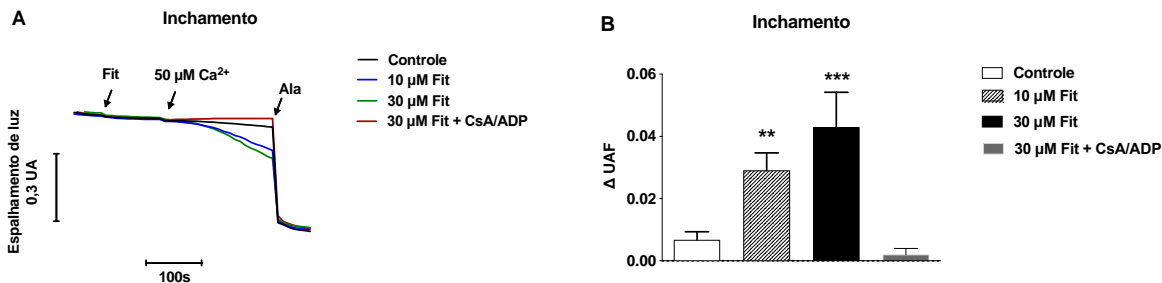


**Figura 9.** Efeito *in vitro* do \u00e1cido fit\u00e2nico (Fit) sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em mitoc\u00f4ndrias de cora\u00e7\u00e3o. Os experimentos foram realizados em meio de incubac\u00e3o contendo as prepara\u00e7\u00f5es mitocondriais (0,35 mg prote\u00edna.  $\text{mL}^{-1}$ ) e glutamato (2,5 mM) mais malato (2,5 mM) como substratos. Ciclosporina A (CsA, 1  $\mu\text{M}$ ) mais ADP (300

$\mu\text{M}$ ) foram adicionados no início dos ensaios, enquanto o Fit (10 - 30  $\mu\text{M}$ ) 50 segundos após. Todos os experimentos se referem a preparações mitocondriais suplementadas por  $\text{Ca}^{2+}$  (30  $\mu\text{M}$ ), como indicado. CCCP (3  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado no fim dos ensaios. Os controles foram realizados na ausência de Fit. Os traçados são representativos de 3 a 4 experimentos independentes (N) e estão expressos como unidade arbitrária de fluorescência (UAF) (A). O painel B apresenta a quantificação dos resultados apresentados no painel A após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os valores são média  $\pm$  desvio padrão de 4 experimentos independentes (N) e estão expressos como  $\Delta\text{UAF}$  entre 150 e 250 s. Análise de variância de uma via (ANOVA) está descrita no texto. **\*\* $P < 0,01$  comparados ao controle (teste de Tukey).**

#### **II.2.6. Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre o inchamento em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens**

Para melhor caracterizar a consequência de indução do PTP mitocondrial, avaliou-se o efeito do Fit (10-30  $\mu\text{M}$ ) sobre o inchamento mitocondrial, utilizando glutamato mais malato e na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  exógeno, em preparações mitocondriais de coração de ratos (50  $\mu\text{M}$ ) (Figura 10). O Fit foi capaz de induzir inchamento mitocondrial na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , que foi totalmente prevenido por CsA mais ADP (painel A), corroborando que o Fit é indutor do PTP mitocondrial dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . A quantificação dos resultados está apresentada no painel B [ $F_{(3,12)}=35,03$ ,  $P < 0,001$ ].

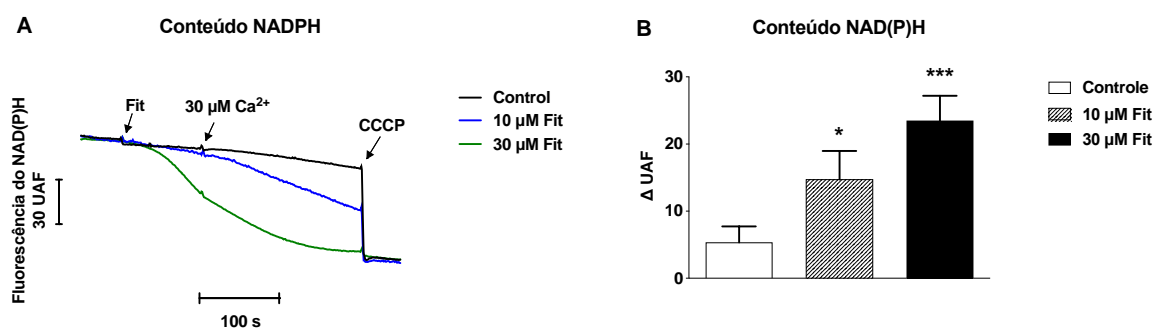


**Figura 10.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre o inchamento em mitocôndrias de coração. Os experimentos foram realizados em meio de incubação contendo as preparações mitocondriais ( $0,35 \text{ mg proteína. mL}^{-1}$ ) e glutamato ( $2,5 \text{ mM}$ ) mais malato ( $2,5 \text{ mM}$ ) como substratos. Ciclosporina A (CsA,  $1 \text{ }\mu\text{M}$ ) mais ADP ( $300 \text{ }\mu\text{M}$ ) foram adicionados no início dos ensaios, enquanto o Fit ( $10 - 30 \text{ }\mu\text{M}$ )  $50$  segundos após. Todos os experimentos se referem a preparações mitocondriais suplementadas por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $50 \text{ }\mu\text{M}$ ), como indicado. Alamecicina (Ala,  $40 \text{ }\mu\text{g/mg}$  de proteína) foi adicionado no fim dos ensaios. Os controles foram realizados na ausência de Fit. Os traçados são representativos de 4 experimentos independentes (N) e estão expressos como unidade arbitrária (UA) (A). O painel B apresenta a quantificação dos resultados apresentados no painel A após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os valores são média  $\pm$  desvio padrão de 4 experimentos independentes (N) e estão expressos como  $\Delta\text{UA}$  entre 150 e 250 s. Análise de variância de uma via (ANOVA) está descrita no texto.  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$  comparados ao controle (teste de Tukey).

### II.2.7. Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens

Verificou-se ainda que o Fit ( $10-30 \text{ }\mu\text{M}$ ) diminuiu o conteúdo de NAD(P)H mitocondrial, que foi intensificado após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $30 \text{ }\mu\text{M}$ ) exógeno, provavelmente

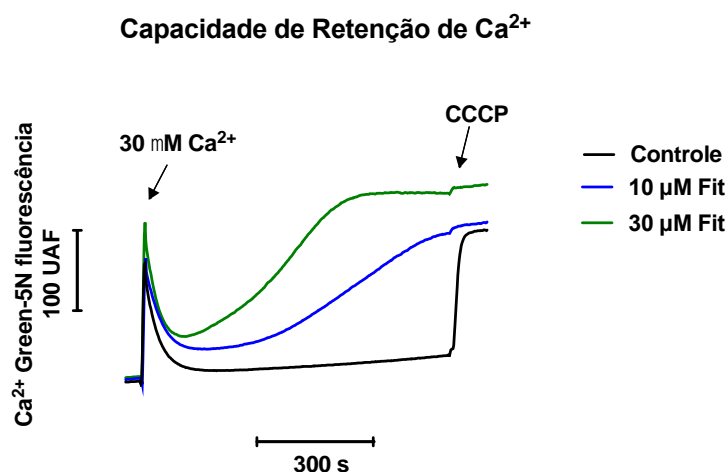
causado pelo efeito desacoplador e de indução da abertura do PTP mitocondrial causado pelo Fit, respectivamente (Figura 11). A quantificação dos resultados está apresentada no painel B [ $F_{(2,9)}=26,38$ ,  $P = 0,001$ ].



**Figura 11.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre o conteúdo de NAD(P)H em mitocôndrias de coração. Os experimentos foram realizados em meio de incubação contendo as preparações mitocondriais ( $0,35 \text{ mg proteína. mL}^{-1}$ ) e glutamato ( $2,5 \text{ mM}$ ) mais malato ( $2,5 \text{ mM}$ ) como substratos. O Fit ( $10 - 30 \text{ }\mu\text{M}$ ) foi adicionado 50 segundos após o início dos ensaios. Todos os experimentos se referem a preparações mitocondriais suplementadas por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $30 \text{ }\mu\text{M}$ ), como indicado. CCCP ( $3 \text{ }\mu\text{M}$ ) foi adicionado no fim dos ensaios. Os controles foram realizados na ausência de Fit. Os traçados são representativos de 4 experimentos independentes (N) e estão expressos como unidade arbitrária de fluorescência (UAF) (A). O painel B apresenta a quantificação dos resultados apresentados no painel A após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os valores são média  $\pm$  desvio padrão de 4 experimentos independentes (N) e estão expressos como  $\Delta\text{UAF}$  entre 150 e 250 s. Análise de variância de uma via (ANOVA) está descrita no texto. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  comparados ao controle (teste de Tukey).

## II.2.8. Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre a capacidade de retenção de $\text{Ca}^{2+}$ em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens

Na próxima etapa do trabalho, o efeito do Fit (10-30  $\mu\text{M}$ ) sobre a capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial foi investigado, que é uma importante função dessa organela para a manutenção da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  celular. A figura 12 mostra que o Fit reduziu fortemente a capacidade mitocondrial de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  após a adição de um pulso de 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  exógeno.

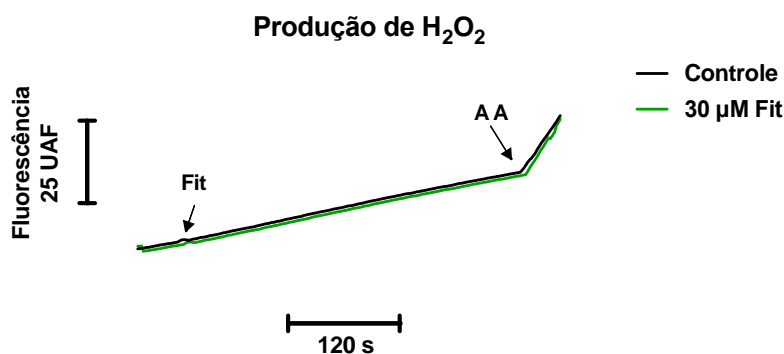


**Figura 12.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre a capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  em mitocôndrias de coração. Os experimentos foram realizados em meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,35 mg proteína.  $\text{mL}^{-1}$ ) e glutamato (2,5 mM) mais malato (2,5 mM) como substratos. O Fit (10 - 30  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado no início dos ensaios. Todos os experimentos se referem a preparações mitocondriais suplementadas por  $\text{Ca}^{2+}$  (30  $\mu\text{M}$ ), como indicado. CCCP (3  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado no fim dos ensaios. Os controles foram realizados na ausência de Fit. Os traçados são representativos de 4 experimentos independentes (N) e estão expressos como unidade arbitrária de fluorescência (UAF).



## II.2.9. Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em preparações mitocondriais de coração de ratos jovens

Finalmente, avaliou-se o efeito do Fit (30  $\mu$ M) sobre a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com o propósito de determinar o envolvimento de ERO nos efeitos observados sobre as funções mitocondriais. A figura 13 mostra que o Fit não alterou a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em mitocôndrias de coração, utilizando glutamato mais malato como substrato e na ausência de Ca<sup>2+</sup> exógeno, indicando que um ataque oxidativo provavelmente não precede os efeitos do Fit sobre parâmetros mitocondriais observados após a adição de Ca<sup>2+</sup>.



**Figura 13.** Efeito *in vitro* do ácido fitânico (Fit) sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em mitocôndrias de coração. Os experimentos foram realizados em meio de incubação contendo as preparações mitocondriais (0,35 mg proteína. mL<sup>-1</sup>) e glutamato (2,5 mM) mais malato (2,5 mM) como substratos. O Fit (30  $\mu$ M) foi adicionado 50 segundos após o início dos ensaios. Antimicina A (0.1  $\mu$ g. mL<sup>-1</sup>) foi adicionada no fim dos ensaios. Os controles foram realizados na ausência de Fit. Os traçados são representativos de 4 experimentos independentes (N) e estão expressos como unidade arbitrária de fluorescência (UAF).

## **PARTE III**

### ***Discussão e Conclusões***

### III.1. DISCUSSÃO

Pacientes acometidos pela doença de Refsum são bioquimicamente caracterizados pelo acúmulo de Fit nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes, sendo que as concentrações plasmáticas podem atingir até 5000  $\mu\text{M}$  (níveis em indivíduos normais: < 30 $\mu\text{M}$ ) (Al-Dirbashi et al., 2008; Wanders et al., 2003; Wierzbicki, 2007). Além do comprometimento neurológico, que é uma das características clínicas marcantes da doença, os pacientes podem desenvolver uma cardiomiopatia, potencialmente fatal, de patogenia ainda pouco conhecida. Neste contexto, as altas concentrações de Fit nos pacientes podem contribuir significativamente para a fisiopatologia da doença, especialmente sobre o tecido cerebral (Busanello et al., 2010; Kahlert et al., 2005; Komen et al., 2007; Schonfeld et al., 2004; Schonfeld e Reiser et al., 2006). No entanto, embora já tenha sido descrito que o Fit atua como desacoplador da fosforilação oxidativa, inibidor do complexo I-III e indutor da produção de ERO em coração (Grings et al., 2012; Schonfeld e Reiser et al., 2006), mais estudos ainda são necessários para esclarecer os mecanismos de toxicidade do Fit sobre o tecido cardíaco, bem como o seu papel na cardiomiopatia que acomete os pacientes com a doença de Refsum.

No intuito de melhor compreender os efeitos do Fit sobre funções mitocondriais, avaliou-se, no presente estudo, os efeitos desse ácido graxo sobre importantes parâmetros da bioenergética mitocondrial e homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  em preparações mitocondriais obtidas de coração de ratos jovens, bem como em cultura de cardiomiócitos (linhagem H9c2).

Inicialmente, verificamos que o Fit aumentou significativamente a respiração mitocondrial no estado 4 em concentrações mais baixas (10  $\mu\text{M}$ ), utilizando glutamato mais malato ou succinato como substratos, em preparações mitocondriais de coração, indicando efeito desacoplador. No entanto, a concentração de 30  $\mu\text{M}$  de Fit não alterou a respiração no

estado 4, o que sugere que, em concentrações mais altas, a respiração mitocondrial possa estar sendo inibida pelo Fit. A observação de que o consumo de  $O_2$  nos estados 3 (estimulado por ADP) e desacoplado (estimulado por CCCP) foi fortemente inibido pelo Fit, na concentração de 30  $\mu M$  e com ambos os substratos respiratórios, confirma que esse ácido graxo se comporta como inibidor metabólico em concentrações mais elevadas. Além disso, observou-se uma diminuição da RCR, sugerindo que os efeitos deletérios provocados pelo Fit sobre a respiração mitocondrial comprometem o acoplamento entre o consumo de  $O_2$  e a produção de ATP. Isso foi confirmado pela observação de uma forte inibição na produção de ATP pelo Fit (10-30  $\mu M$ ) em preparações mitocondriais de coração, utilizando glutamato mais malato como substratos.

Também se observou que o Fit foi capaz de aumentar a respiração mitocondrial no estado 4 em cardiomiócitos permeabilizados com digitonina, utilizando uma combinação de substratos ligados ao NADH (piruvato mais malato mais glutamato) e  $FADH_2$  (succinato), indicando que o efeito desacoplador ocorre numa preparação celular em que as mitocôndrias estão integradas ao ambiente citosólico, que melhor mimetiza uma situação *in vivo* (Makrecka-Kuka et al., 2015). Por outro lado, não se pode descartar que o efeito de inibição metabólica também ocorra nestes sistemas com concentrações mais elevadas de Fit, em comparação às que foram utilizadas neste trabalho.

No que diz respeito aos mecanismos responsáveis pelo efeito desacoplador causado pelo Fit, é possível que seja resultado do mecanismo protonofórico exibido pelo par ácido/base conjugada, consistindo em se unir a  $H^+$  no espaço intermembrana e se difundir para a matriz mitocondrial, posteriormente retornando ao espaço intermembrana utilizando um transportador aniônico na membrana mitocondrial interna, dessa forma diminuindo a  $\Delta\Psi_m$  (Schonfeld e Bohnensack, 1997; Schonfeld e Schild, 1989; Schonfeld, 1992). Neste

particular, considerando que o AT, inibidor do ANT, não causou nenhuma influência sobre o aumento da respiração no estado 4 induzido pelo Fit em mitocôndrias de coração, sugere-se que o ANT não contribui para o efeito desacoplador causado pelo Fit. No entanto, não se pode excluir que outro transportador esteja sendo utilizado pelo Fit para exercer o mecanismo de desacoplamento, incluindo proteínas desacopladoras (UCPs), transportadores de carboxilatos e carreadores de fosfato (Goglia e Skulachev, 2003; Schonfeld et al., 2000; Zackova et al., 2000).

Por outro lado, com relação ao efeito de inibição metabólica provocado pelo Fit, acredita-se que se deva, ao menos em parte, pela expressiva inibição da atividade dos complexos da cadeia respiratória I, II, II-III e IV, bem como da SDH, enzima que pertence ao complexo II, que foi verificada em mitocôndrias de coração. Esses resultados corroboram com um estudo anterior que observou inibição do complexo I-III em homogeneizado de coração, pelo Fit em altas concentrações (500  $\mu\text{M}$ ) (Grings et al., 2012).

Além disso, o presente estudo verificou que o Fit reduziu drasticamente a  $\Delta\Psi\text{m}$  e induziu inchamento em mitocôndrias de coração na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizando glutamato mais malato como substratos. Esses efeitos foram devidos à abertura do PTP mitocondrial dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , uma vez que foram totalmente prevenidos por CsA mais ADP, os quais são clássicos inibidores do PTP por se ligarem à ciclofilina D (Saito e Castilho, 2010) e ao ANT (Yarana et al., 2012), respectivamente. A permanente abertura do PTP resulta em liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol e de fatores apoptogênicos intramitocondriais, como o citocromo c, despolarização e inchamento mitocondrial, perda de GSH, NADH e NADPH, comprometimento da síntese de ATP e morte celular (apoptose e necrose) (Bernardi e Von Stockum, 2012; Rasola e Bernardi, 2011; Rizzuto et al., 2012; Vercesi et al., 2018; Liu et al., 1996). As observações de que o Fit também foi capaz de diminuir o conteúdo de NAD(P)H

e a capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  em preparações mitocondriais de coração, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , corroboram com a hipótese de indução do PTP pelo Fit. Cabe aqui salientar que já foi anteriormente demonstrado que o Fit, em altas concentrações (250-500  $\mu\text{M}$ ), foi capaz de reduzir a  $\Delta\Psi\text{m}$  e o conteúdo de NAD(P)H em mitocôndrias de coração na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , possivelmente associado ao efeito desacoplador desse ácido graxo (Grings et al., 2012).

Ressalta-se ainda que uma alteração na homeostase bioenergética e do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial pelo Fit pode comprometer severamente a fisiologia cardíaca, uma vez que a manutenção das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e apropriado suprimento de ATP são fundamentais para a contração cardíaca, podendo assim levar a morte celular (Drago et al., 2012; Luo e Anderson, 2013). Neste contexto, destaca-se o elevado volume mitocondrial dos cardiomiócitos, por volta de 30 %, sendo esta organela responsável por fornecer mais de 95 % do ATP demandado por essas células (Piquereau et al., 2013; Rosenberg, 2004). Portanto, é presumível que o tecido cardíaco seja altamente susceptível a danos sobre funções mitocondriais, como demonstrado numa série de doenças cardíacas, tais como lesão da isquemia-reperfusão, hipertrofia cardíaca, hipertensão, aterosclerose e falência cardíaca (Murphy e Steenbergen, 2008; Ramaccini et al., 2021; Siasos et al., 2018), bem como em erros inatos do metabolismo que afetam o coração, como a acidemia propiônica (Roginski et al., 2020; Tamayo et al., 2020).

A indução da abertura do PTP pelo Fit pode estar relacionada ao seu efeito desacoplador e de inibição metabólica, como já foi previamente demonstrado para outros compostos. Por outro lado, embora a ativação do PTP tenha sido largamente relacionada à produção de espécies reativas (Vercesi et al., 2018), e trabalhos prévios demonstraram indução de estresse oxidativo pelo Fit em altas concentrações (Grings et al., 2012; Schonfeld e Reiser, 2006; Schonfeld e Wojtczak, 2007), o envolvimento deste mecanismo é pouco

provável pois não foi verificado aumento na produção de  $H_2O_2$  nas condições experimentais testadas neste trabalho.

Embora as concentrações de Fit testadas neste estudo (10-30  $\mu M$ ) sejam inferiores às já descritas no plasma de pacientes acometidos pela Doença de Refsum, é difícil determinar a relevância fisiopatológica dos resultados obtidos, uma vez que as concentrações de Fit no coração dos pacientes ainda não estão estabelecidas. Entretanto, é possível que concentrações teciduais de Fit, particularmente no tecido cardíaco, sejam significativamente superiores às encontradas em plasma, uma vez que o defeito metabólico é intracelular e o coração é um órgão com elevado metabolismo de ácidos graxos (Murashige et al., 2020).

## **III.2. CONCLUSÕES**

Concluindo, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram, pela primeira vez, que o Fit se comporta como um desacoplador da fosforilação oxidativa, inibidor metabólico e indutor do PTP mitocondrial, resultando em severo distúrbio na homeostase bioenergética e do  $\text{Ca}^{2+}$  em coração. No caso dos presentes resultados *in vitro* serem confirmados *in vivo*, em modelos animais e em tecidos de pacientes afetados pela Doença de Refsum, presume-se que uma disfunção mitocondrial causada pelo Fit pode contribuir, ao menos em parte, para a patogênese da cardiomiopatia característica dessa doença.

## **III.3. PERSPECTIVAS**

- Investigar o efeito do Fit sobre parâmetros da função mitocondrial e a indução do PTP mitocondrial em cultura de cardiomiócitos.
- Investigar o efeito do Fit sobre parâmetros da função mitocondrial no coração em modelos animais da Doença de Refsum.



## REFERÊNCIAS

ADAM-VIZI, V.; STARKOV, A. A. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 20, p. S413-26, Jun. 2010. DOI: 10.3233/JAD-2010-100465

AKERMAN, K. E.; WIKSTROM, M. K. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Letters**. v. 68, p. 191-7, Out. 1976. DOI: 10.1016/0014-5793(76)80434-6

AL-DIRBASHI, O. Y. et al. Rapid UPLC-MS/MS method for routine analysis of plasma pristanic, phytanic, and very long chain fatty acid markers of peroxisomal disorders. **Journal in Lipid Research**. v. 49, p. 1855-62, Ab. 2008. DOI: 10.1194/jlr.D800019-JLR200

ALLEN, N. E. et al. Phytanic acid: Measurement of plasma concentrations by gas-liquid chromatography-mass spectrometry analysis and associations with diet and other plasma fatty acids. **British Journal of Nutrition**. v. 99, p. 653-9, Mar. 2008. DOI: 10.1017/S000711450782407X

AMARAL, A. U. et al. 2-Methylcitric acid impairs glutamate metabolism and induces permeability transition in brain mitochondria. **Journal of Neurochemistry**. v. 137, n. 1, p. 62-75, Feb. 2016. DOI: 10.1111/jnc.13544

BAINES, C. P. et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. **Nature**. v. 434, 7033, p. 658-62, Mar. 2005. DOI: 10.1038/nature03434

BAUGHMAN, J. M. et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**. v. 476, p. 341-5, Jun. 2011. DOI: 10.1038/nature10234

BERNARDI, P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? **Frontiers in Physiology**. v. 4, p. 95, Maio 2013. DOI:10.3389/fphys.2013.00095

BERNARDI, P.; VON STOCKUM, S. The permeability transition pore as a Ca (2+) release channel: new answers to an old question. **Cell Calcium**. v. 52, p. 22-7, Jun. 2012. DOI: 10.1016/j.ceca.2012.03.004

BERNARDI, P.; CARRAROL, M.; LIPPE, G. The mitochondrial permeability transition: Recent progress and open questions. **The FEBS Journal**. Out. 2021. DOI: 10.1111/febs.16254

BORGES, C. G. et al. Reactive nitrogen species mediate oxidative stress and astrogliosis provoked by in vivo administration of phytanic acid in cerebellum of adolescent

rats: A potential contributing pathomechanism of cerebellar injury in peroxisomal disorders. **Neuroscience**. v. 304, p. 122-32, Set. 2015. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.07.028

BRUNMAIR, B. et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? **Diabetes**. v. 53, p. 1052-9, Abr. 2004. DOI: 10.2337/diabetes.53.4.1052

BUSANELLO, E. N. et al. In vitro evidence that phytanic acid compromises Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and the electron flow through the respiratory chain in brain cortex from young rats. **Brain Research**. v. 1352, p. 231-38, 2010.

CECATTO C, et al. Ethylmalonic acid induces permeability transition in isolated brain mitochondria. **Neurotoxicity Research**. v. 26, p. 168-78, Fev. 2014. DOI: 10.1007/s12640-014-9460-5

CECATTO C, et al. Metabolite accumulation in VLCAD deficiency markedly disrupts mitochondrial bioenergetics and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the heart. **The FEBS Journal**. v. 285, p. 1437-55, Mar. 2018. DOI: 10.1111/fev.14419

DE STEFANI, D. et al. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**. v. 476, p. 336-40, Jun. 2011. DOI: 10.1038/nature10230

DRAGO, D. et al. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> peaks in cardiomyocytes, **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.** v. 109, p. 12986-12991, Ago. 2012. DOI: 10.1073/pnas.1210718109

FERDINANDUSSE, S. et al. Stereochemistry of the peroxisomal branched-chain fatty acid alpha- and beta- oxidation systems in patients suffering from different peroxisomal disorders. **Journal in Lipid Research**. v. 43, p. 438-44, Mar. 2002. DOI: 10.1016/S0022-2275(20)30150-4

FERRANTI, R. et al. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening decreases reactive oxygen species generation. **FEBS Letters**. v. 536, p. 51-5, Fev. 2003. DOI: 10.1016/s0014-5793(03)00007-3

FIGUEIRA, T. R. et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 18, p. 2029-74, Jun. 2013. DOI: 10.1089/ars.2012.4729

FISCHER, J. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**. v. 153, p. 23-36, Nov. 1985. DOI: 10.1016/0009-8981(85)90135-4

GOGLIA, F.; SKULACHEV, V. P. A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the

inner to the outer membrane leaflet. **FASEB Journal**. v. 17, pag.1585–1591, Set. 2003. DOI: 10.1096/fj.03-0159hyp

GARBINCIUS, J. F.; ELROD, J. W. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. **Physiological Reviews**. v. 102, n. 2, p. 893-992, Abr. 2022. DOI: 10.1152/physrev.00041.2020.

GRINGS, M. et al. Phytanic Acid Disturbs Mitochondrial Homeostasis in Heart of Young Rats: A Possible Pathomechanism of Cardiomyopathy in Refsum. **Disease Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 366, p. 335-43, Jul. 2012. DOI: 10.1007/s11010-012-1311-1

KAHLERT, S. et al. The Refsum disease marker phytanic acid, a branched chain fatty acid, affects Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes. **Neurobiology of Disease**. v. 18, p. 110–118, Fev. 2005. DOI: 10.1016/j.nbd.2004.08.010

HE, A.; DEAN, J. M.; LODHI, I. J. Peroxisomes as cellular adaptors to metabolic and environmental stress. **Trends in Cell Biology**. v. 31, n. 8, p.656-670, Agos. 2021. DOI: 10.1016/j.tcb.2021.02.005

HOEK, J. B.; RYDSTROM, J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. **Biochemical Journal**. v. 254, p. 1-10, Ago. 1988. DOI: 10.1042/bj2540001

KOH, J. T. et al. Cardiac characteristics of transgenic mice overexpressing Refsum disease gene-associated protein within the heart. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 286, p. 1107-1116, Set. 2001. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5510

KOMEN, J. C. et al. Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 64, p. 3271–3281, Out. 2007. DOI: 10.1007/s00018-007-7357-7

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**. v. 495, p. 12-5, Abr. 2001. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02316-x

KUZNETSOV, A. et al. H9c2 and H1-1 cells demonstrate disting features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivy to hypoxia-reoxygenation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1853, p. 276-284, Fev. 2015. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.11.015

LEHNINGER, A. L. et al. Regulation of Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 75, p. 1690-4, Abr. 1978. DOI: 10.1073/pnas.75.4.1690

LEIPNITZ, G. et al. Neurochemical evidence that phytanic acid induces oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in cerebellum and cerebral cortex of rats. **Life Sciences**. v. 87, p. 275–280, Ago. 2010. DOI: 10.1016/j.lfs.2010.06.015

LIU, X. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**. v. 86, p. 147-57, Jul. 1996. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80085-9

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-75, Nov. 1951.

LUO, M.; ANDERSON, M. E. Mechanisms of altered Ca(2)(+) handling in heart failure. **Circulation Research**. v. 113, pag.690–708, Ago. 2013. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301651

MACIEL, E. N. et al. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca<sup>2+</sup> and respiratory chain complex II inhibition. **Journal of Neurochemistry**. v. 90, p. 1025-35, Set. 2004. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02565.x

MAKRECKA-KUKA, M. et al. High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. **Biomolecules**. v. 5, p. 1319-38, Jun. 2015. DOI: 10.3390/biom5031319

MARCHI, S.; PINTON, P. The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. **The Journal of Physiology**. v. 592, p. 829-39, Mar. 2014. DOI: 10.1113/jphysiol.2013.268235

MIRANDOLA, S. R. et al. 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. **Journal of Neuroscience Research**. v. 88, p. 630-9, Fev. 2010. DOI: 10.1002/jnr.22239

MOHANTY, J. G. et al. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. **Journal of Immunological Methods**. v. 202, n. 2, p. 133-41, Mar. 1997. DOI: 10.1016/s0022-1759(96)00244-x

MONNIG, G. et al. Phytanic acid accumulation is associated with conduction delay and sudden cardiac death in sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x deficient mice. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**. v. 15, p. 1310–16, Nov. 2004. DOI: 10.1046/j.1540-8167.2004.03679.x

MURASHIGE, D. et al. Comprehensive Quantification of Fuel Use by the Failing and Nonfailing Human Heart. **Science**. v. 370, p. 364–368, Out. 2020. DOI: 10.1126/science.abc8861

MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. **Physiological Reviews**. v.88, p. 581–609, Abr. 2008. DOI: 10.1152/physrev.00024.2007

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics**. 4th Edition. London: Academic Press Elsevier Science, 2013.

NICHOLLS, D. Mitochondrial proton leaks and uncoupling proteins. **Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics**. v. 1862, p. 148428, Jul. 2021. DOI: 10.1016/j.bbabi.2021.148428

PAN, X. et al. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. **Nature Cell Biology**. v. 15, p. 1464-72, Dez. 2013. DOI: 10.1038/ncb2868

PENDIN, D. et al. The elusive importance of being a mitochondrial Ca(2+) uniporter. **Cell Calcium**. v. 55, p. 139-45, Mar. 2014. DOI: 10.1016/j.ceca.2014.02.008

PIQUEREAU, J. et al. Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? **Frontiers in Physiology**. v. 4, pag. 102, Maio 2013. DOI: 10.3389/fphys.2013.00102

RAMACCINI, D. et al. Mitochondrial Function and Dysfunction in Dilated Cardiomyopathy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v. 8, Jan. 2021. DOI: 10.3389/fcell.2020.624216

RASOLA, A.; BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**. v. 50, p. 222-33, Set. 2011. DOI: 10.1016/j.ceca.2011.04.007

REISER, G. et al. Mechanism of toxicity of the branched-chain fatty acid phytanic acid, a marker of Refsum disease, in astrocytes involves mitochondrial impairment. **International Journal Developmental Neuroscience**. v. 24, p. 113–22, Nov. 2005. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2005.11.002

RIZZUTO, R. et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 13, p. 566-78, Set. 2012. DOI: 10.1038/nrm3412

ROGINSKI, A. C. et al. Disturbance of bioenergetics and calcium homeostasis provoked by metabolites accumulating in propionic acidemia in heart mitochondria of developing rats. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**. v.1866, ed. 5, p. 165682, Maio 2020. DOI: 10.1016/j.bbadis.2020.165682

RONICKE, S. et al. The influence of the branched-chain fatty acids pristanic acid and Refsum disease associated phytanic acid on mitochondrial functions and calcium regulation

of hippocampal neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. **Neurobiology Disease**. v. 36, p. 401–410, Nov. 2009. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.08.005

ROSENBERG, P. Mitochondrial dysfunction and heart disease. **Mitochondrion**. v. 4, pag. 621–628, Set. 2004. DOI: 10.1016/j.mito.2004.07.016

RUSTIN, P. et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**. v. 228, p. 35-51, Jul. 1994. DOI: 10.1016/0009-8981(94)90055-8

SAITO, A.; CASTILHO, R. F. Inhibitory effects of adenine nucleotides on brain mitochondrial permeability transition. **Neurochemical Research**. v. 35, p. 1667-74, Nov. 2010. DOI: 10.1007/s11064-010-0228-x

SCHONFELD, P. Anion permeation limits the uncoupling activity of fatty acids in mitochondria. **FEBS Letters**. v. 303, p.190–192, Jun. 1992.

SCHONFELD, P. et al. In brain mitochondria the branched-chain fatty acid phytanic acid impairs energy transduction and sensitizes for permeability transition. **Biochemical Journal**. v. 383, p. 121–8, Out. 2004. DOI: 10.1042/BJ20040583

SCHONFELD, P.; BOHNENSACK, R. Fatty acid- promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ ATP carrier. **FEBS Letters**. v. 420, p. 167–170, Dez. 1997. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)01511-1

SCHONFELD, P.; SCHILD, L.; KUNZ, W. Long-chain fatty acids act as protonophoric uncouplers of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 977, p. 266–272, Dez. 1989. DOI: 10.1016/s0005-2728(89)80080-5

SCHONFELD, P.; REISER, G. Rotenone-like Action of the Branched-Chain Phytanic Acid Induces Oxidative Stress in Mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, p. 7136-7142, Mar. 2006. DOI: 10.1074/jbc.M513198200

SCHONFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1767, ed. 8, p. 1032-40, Ago. 2007. DOI: 10.1016/j.bbabbio.2007.04.005

SCHONFELD, P.; WIECHOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Long-chain fatty acid-promoted swelling of mitochondria: further evidence for the protonophoric effect of fatty acids in the inner mitochondrial membrane. **FEBS Letters**. v. 471, p. 108–112, Abr. 2000. DOI: 10.1016/s0014-5793(00)01376-4

SIASOS, G. et al. Mitochondria and cardiovascular diseases—from pathophysiology to treatment. **Annals of Translational Medicine**. v. 6, p. 256–256, Jun. 2018. DOI: 10.21037/atm.2018.06.21

TAMAYO, M. et al. Intracellular calcium mishandling leads to cardiac dysfunction and ventricular arrhythmias in a mouse model of propionic acidemia. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**. v. 1, p. 1866, Jan. 2020. DOI: 10.1016/j.bbadis.2019.165586

TONIN, A. M. et al. Mitochondrial bioenergetics deregulation caused by long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain: a possible role of mPTP opening as a pathomechanism in these disorders? **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1842, p. 1658-67, Set. 2014. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.06.011

VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H.; OUCHIDA, A. T.; NOBERG, E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 482, p. 426-431, Nov. 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.088

VERCESI, A.E. et al. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition, **Free Radical Biology and Medicine**. v. 129, p. 1-24, Dez. 2018. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.034

VERHOEVEN, N.; JAKOBS, C. Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. **Progress in Lipid Research**. v. 40, p. 453-66, Nov. 2001. DOI: 10.1016/s0163-7827(01)00011-x

WANDERS, R. et al. Refsum disease, peroxisomes and phytanic acid oxidation: a review. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**. v. 60, p. 1021-31, Nov. 2001a. DOI: 10.1093/jnen/60.11.1021

WANDERS, R. J. et al. Refsum disease. **The online metabolic and molecular bases of inherited disease**. McGraw-Hill, New York, p. 3303–22, 2001b.

WANDERS, R. et al. Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1631, p. 119-35, Mar. 2003. DOI: 10.1016/s1388-1981(03)00003-9

WANDERS, R.; KOMEN, J. Peroxisomes, Refsum's disease and the alpha and omega-oxidation of phytanic acid. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, p. 865-9, 2007. DOI: 10.1042/BST0350865

WANDERS, R.; JAKOBS, C.; SKJELDAL, O. H. Refsum Disease. In: VALLE, D.L. et al. **The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. McGraw Hill, 2019. DOI: 10.1036/ommbid.161

WATERHAM, H. R.; FERDINANDUSSE, S.; WANDERS, R. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1863, p. 922-933, Nov. 2016. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.015

WEINSTEIN, R. Phytanic Acid Storage Disease (Refsum's Disease): Clinical Characteristics, Pathophysiology and the Role of Therapeutic Apheresis in Its Management. **Journal of Clinical Apheresis**. v. 14, p. 181–4, Dec. 1999. DOI: 10.1002/(sici)1098-1101(1999)14:4<181::aid-jca5>3.0.co;2-z

WIERZBICKI, A. Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, p. 881-6, Nov. 2007. DOI: 10.1042/BST0350881

WIERZBICKI, A.; LLOYD, M. Dr Brian Gibberd (1931-2006): a pioneering clinician in Refsum's disease. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, p. 862-4, Nov. 2007. DOI: 10.1042/BST0350862

YARANA, C. et al. Calcium- induced cardiac mitochondrial dysfunction is predominantly mediated by cyclosporine A-dependent mitochondrial permeability transition pore. **Archives of Medical Research**. v. 43, p. 333–338, Jul. 2012. DOI: 10.1016/j.arcmed.2012.06.010

ZAGO, E. B. et al. The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. **FEBS Letters**. v. 478, p. 29-33, Jul. 2000. DOI: 10.1016/s0014-5793(00)01815-9

ZACKOVA, M.; KRAMER, R.; JEZEK, P. Interaction of mitochondrial phosphate carrier with fatty acids and hydrophobic phosphate analogs. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 32, p. 499–508, Maio 2000. DOI: 10.1016/s1357-2725(00)00006-6



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – $\alpha$ -oxidação peroxissomal .....	10
<b>Figura 2</b> – $\beta$ -oxidação do ácido pristânico .....	11
<b>Figura 3</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre o estado 4 (A), o estado 3 (B), o estado desacoplado (C) e a razão de controle respiratório (RCR) (D) em mitocôndrias de coração.....	29
<b>Figura 4</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre o estado 4 (A), o estado 3 (B), o estado desacoplado (C) e a razão de controle respiratório (RCR) (D) em mitocôndrias de coração.....	30
<b>Figura 5</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre o estado 4 na presença de atractilósídeo (AT, 30 $\mu$ M) em mitocôndrias de coração.....	31
<b>Figura 6</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre parâmetros respiratórios em cultura de cardiomiócitos permeabilizados.....	32
<b>Figura 7</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre o complexo I (A), II (B), II-III (C), IV (D) e succinato desidrogenase (SDH) (E) em mitocôndrias de coração .....	34
<b>Figura 8</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre a produção de ATP em mitocôndrias de coração.....	35
<b>Figura 9</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em mitocôndrias de coração.....	36
<b>Figura 10</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre o inchamento em mitocôndrias de coração.....	38

<b>Figura 11</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre o conteúdo de NAD(P)H em mitocôndrias de coração.....	39
<b>Figura 12</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre a capacidade de retenção de Ca <sup>2+</sup> em mitocôndrias de coração.....	40
<b>Figura 13</b> – Efeito <i>in vitro</i> do ácido fitânico (Fit) sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em mitocôndrias de coração.....	41

## ANEXO I



**U F R G S**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 39538

**Título:** ESTUDO DOS EFEITOS DO ACIDO FITANICO SOBRE A BIOENERGETICA MITOCONDRIAL E HOMEOSTASE DO CALCIO EM CORACAO DE RATOS

**Vigência:** 01/11/2020 à 31/10/2022

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

MOACIR WAJNER - coordenador desde 01/11/2020

Ângela Beatris Zemniçak - desde 01/11/2020

Ana Cristina Roginski - desde 01/11/2020

**Equipe Externa:**

Alexandre Umpierrez Amaral - pesquisador desde 01/11/2020

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 26/10/2020 - Reunião via webconferência - Sistema UFRGS - Mconf, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 96 ratos Wistar, machos, com 30 dias de idade provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica/ICBS/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Quinta-Feira, 5 de Novembro de 2020.

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Coordenador da comissão de ética