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

Marina Rocha Frusciante Santi

O SULFETO DE HIDROGÊNIO E O TIOSSULFATO INDUZEM DISFUNÇÃO BIOENERGÉTICA E ALTERAM O ESTADO REDOX EM INTESTINO DE RATOS

Porto Alegre
2026

Marina Rocha Frusciante Santi

O SULFETO DE HIDROGÊNIO E O TIOSSULFATO INDUZEM DISFUNÇÃO BIOENERGÉTICA E ALTERAM O ESTADO REDOX EM INTESTINO DE RATOS

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

Orientador: Prof.Dr.Guilhian Leipnitz.

Porto Alegre
2026

CIP - Catalogação na Publicação

Rocha Frusciante Santi, Marina
O SULFETO DE HIDROGÊNIO E O TIOSSULFATO INDUZEM DISFUNÇÃO BIOENERGÉTICA E ALTERAM O ESTADO REDOX EM INTESTINO DE RATOS / Marina Rocha Frusciante Santi. -- 2025.
51 f.
Orientador: Guilhian Leipnitz.

Tese (Doutorado) -- 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, 2025.

1. ERROS INATOS DO METABOLISMO. 2. SULFETO DE HIDROGÊNIO . 3. TIOSSULFATO. 4. DISFUNÇÃO BIOENERGÉTICA. 5. ESTADO REDOX. I. Leipnitz, Guilhian, orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus, que tem me ensinado sobre a vida acontecer na ordem Dele e não na minha. Agradeço por ter conseguido a força de passar por uma mudança de universidade, troca de orientação, troca de projeto em meio á um problema sério na minha saúde, gestação do meu filho João Henrique e todas as atribulações de conciliar carreira com a maternidade. Para somar, a pandemia sucedeu todos esses acontecimentos e me fez viver um Doutorado diferente do planejado.

Aos meus pais Regina e Romeu, e à minha irmã Maria Clara, que sempre foram meus maiores incentivadores, meus protetores e meu exemplo para ser uma pessoa do bem. Estar aqui hoje vem da base que vocês sempre foram para mim e do amor, segurança e princípios que me passaram. Hoje completo um ciclo que me faz sentir uma profissional comprometida e responsável. Muito obrigada meus amores, esse título vai para vocês.

Ao meu filhotinho, meu parceiro de fim de experimentos, a razão da minha vida, meu "tutu", meu cisco de gente, meu ar… Filho, mamãe te ama mais que tudo, e você é a fonte que me dá forças para concluir essa etapa importante da minha vida, por você eu quero ser mais. TE AMO INFINITO JOÃO HENRIQUE (Quique)!

Ao meu parceiro de vida Victorio Santi, meu amor, meu marido, pai exemplar pro nosso filho, por ser nosso porto seguro, por ser a razão quando preciso no meio de tantas emoções que sinto. Obrigada por não soltar minha mão, e por tudo que fez e faz por nossa família, te amo e te admiro.

Aos meus queridos avós Osmar, Lilia e Babi, que sempre torceram muito para esse doutorado ser concluído. Sempre levei em consideração cada palavra dita

por vocês, amo vocês eternamente. Não posso esquecer de citar aqui também a minha tia Mi, e madrinha Pati por me ajudarem sempre no Empório, para que minha ausência durante esse processo de conclusão não prejudicasse o andamento da empresa. Amo vocês gurias!

À minha irmã de alma, minha melhor amiga Laressa Obregon, obrigada por estar comigo em TODAS as fases da minha vida.

Não posso deixar de agradecer a eles, meus colegas de laboratório que viraram amigos, Belisa, Mateus, Júlia e Cris, sem vocês tudo seria muito mais difícil, serei eternamente grata por toda ciência compartilhada, mas principalmente por cada risada e momentos juntos.

Ao pessoal dos laboratórios 27/34/38 por toda ajuda sempre, em especial á Marian, que foi peça chave neste trabalho, OBRIGADA.

Aos amigos que fiz na Bioquímica, Rômulo Almeida, Débora Guerini, Bruna Bellaver, Igor Fontana, Fernanda Valiatti e nossa querida Silvana, guardo vocês com carinho.

Às minhas colegas de graduação, que são minhas amigas da vida, Bruna, Gisele, Luciana e Thamara, pra sempre nós Biomedgirls.

À minha primeira orientadora da vida, que hoje é minha amiga, Cláudia Funchal, por todos ensinamentos e oportunidades, minha eterna gratidão.

À galera da ART, que me cedeu uma mesinha e me acolheu neste período de conclusão da tese. Vocês são maravilhosos, essa energia do time que me carregou neste período.

À Sabrina, quem me ajuda há anos a organizar meus sentimentos e teve papel fundamental neste fechamento de ciclo.

Por fim, ao meu orientador Guilhian, que, além de me acolher após mudança de orientação, não desistiu de mim, e teve toda paciência do mundo em cada fase que passei, ele esperou e me ajudou a chegar aqui. Nunca terei palavras suficientes para te agradecer. Obrigada por tudo, Gui!

SUMÁRIO

PARTE I 8
RESUMO 9
ABSTRACT 10
LISTA DE ABREVIATURAS 11
1. INTRODUÇÃO 12
1.1. Erros Inatos do Metabolismo 12
1.2. Catabolismo de aminoácidos sulfurados 12
1.3. Encefalopatia Etilmalônica 14
1.4. Fisiopatologia da EE 16
1.5 Fosforilação oxidativa 17
1.6 Creatina cinase 18
2. OBJETIVOS 19
2.1. Objetivo geral 19
2.2. Objetivos específicos 19
PARTE II 21
3. RESULTADOS 22
PARTE III 35
4. DISCUSSÃO 36
5. CONCLUSÃO 43
6. PERSPECTIVAS 43
7.REFERÊNCIAS 44

PARTE I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

RESUMO

A encefalopatia etilmalônica (EE) é um grave distúrbio metabólico hereditário do metabolismo do enxofre, causado pela deficiência na atividade da proteína da encefalopatia etilmalônica 1 (ETHE1). A EE é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária de compostos sulfurados, tais como sulfeto de hidrogênio (sulfeto) e tiossulfato, além de ácido etilmalônico. Os pacientes portadores desta doença apresentam manifestações clínicas graves, predominantemente neurológicas. Contudo, diarreia hemorrágica crônica associada a alterações na mucosa intestinal também é frequentemente observada. Visto que a fisiopatologia desses distúrbios intestinais na EE permanece pouco elucidada e que o sulfeto e o tiossulfato são moléculas altamente reativas, o presente trabalho investigou os efeitos desses metabólitos sobre a produção e a transferência bioenergética, bem como a homeostase redox, no intestino de ratos. Também avaliamos os efeitos do sulfeto e do tiossulfato sobre a viabilidade de células Caco-2, uma linhagem de carcinoma de cólon humana, muito usada por sua semelhança a enterócitos normais. Observamos que o sulfeto reduziu a respiração mitocondrial na presença de substratos que geram NADH e $FADH_2$ no intestino, efeito que foi prevenido pela glutationa reduzida (GSH), mas não pela melatonina. O tiossulfato, por sua vez, não alterou significativamente a respiração mitocondrial. Além disso, ambos os metabólitos reduziram de forma significativa a atividade da creatina cinase (CK) total bem como das isoformas citosólica e mitocondrial dessa enzima no intestino dos ratos. A co-incubação com GSH, mas não com melatonina, apocinina ou trolox (vitamina E hidrossolúvel), preveniu as alterações nas atividades da CK total e de suas isoformas causadas tanto pelo sulfeto quanto pelo tiossulfato. Ainda vimos que o sulfeto aumentou o conteúdo de grupos tióis no intestino e as concentrações de GSH, sem alterar os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a formação de carbonilas, indicando uma possível modulação do estado redox desse tecido. Esses resultados aliados ao fato de que apenas a GSH preveniu os efeitos inibitórios do sulfeto e do tiossulfato sobre a atividade da CK sugerem ainda que esses efeitos ocorrem via modificação direta dos grupos tióis dessa enzima e não por ação de espécies reativas. Por fim, o sulfeto e tiossulfato reduziram a viabilidade de células Caco-2. Nossos dados sugerem que o comprometimento bioenergético mitocondrial e a desregulação da homeostase redox causados pelo sulfeto e tiossulfato são possíveis mecanismos envolvidos nas alterações gastrointestinais crônicas observadas em pacientes com EE.

Palavras-chave: Encefalopatia etilmalônica, sulfeto de hidrogênio, tiossulfato, metabolismo energético, homeostase redox, intestino.

ABSTRACT

Ethylmalonic encephalopathy (EE) is a severe inherited metabolic disorder of sulfur metabolism caused by the deficient activity of the enzyme ethylmalonic encephalopathy 1 protein (ETHE1). This disorder is biochemically characterized by the predominant tissue accumulation and increased urinary excretion of sulfur compounds, such as hydrogen sulfide (sulfide) and thiosulfate, in addition to ethylmalonic acid. Patients present with severe clinical manifestations, predominantly neurological symptoms. Chronic hemorrhagic diarrhea associated with alterations in the intestinal mucosa is also often observed. Considering that the pathophysiology of intestinal abnormalities in EE remains poorly understood, and that sulfide and thiosulfate are highly reactive molecules, the present study investigated the effects of these metabolites on energy production and transfer, as well as redox homeostasis, in the intestine of rats. We observed that sulfide reduced the mitochondrial respiration driven by substrates linked to NADH and $FADH_2$ in the intestine, an effect that was prevented by reduced glutathione (GSH), but not by melatonin. In contrast, thiosulfate did not alter the respiration. Furthermore, both metabolites significantly reduced the activity of total creatine kinase (CK) as well as the activity of its cytosolic and mitochondrial isoforms in the intestine of rats. In addition, the co-incubation with GSH, but not melatonin, apocynin or trolox (water-soluble vitamin E), prevented the alterations in the activities of total CK and its isoforms caused by sulfide and thiosulfate. Furthermore, sulfide increased intestinal thiol groups and GSH concentrations without altering thiobarbituric acid reactive substances levels and carbonyl formation, indicating a possible modulation of the tissue redox state. These results, together with the fact that only GSH prevented the inhibitory effects of sulfide and thiosulfate on CK activity, further suggest that these effects occur via direct alteration of the thiol groups of this enzyme and not though reactive species. Finally, sulfide and thiosulfate reduced the viability of Caco-2 intestinal cells. Our data suggest that mitochondrial bioenergetic impairment and redox homeostasis dysregulation caused by sulfide and thiosulfate are possible mechanisms involved in the chronic gastrointestinal alterations observed in patients with EE.

Keywords: Ethylmalonic encephalopathy, hydrogen sulfide, thiosulfate, energy metabolism, redox homeostasis, intestine.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-MST – 3-Mercaptopiruvato Sulfotransferase

ATP – Adenosina-5’-Trifosfato

CBS – Cistationina β-Sintase

CK – Creatina Cinase

CSE – γ-Cistationase

CT – Cisteína Aminotransferase

CTE – Cadeia Transportadora de Elétrons

EE – Encefalopatia Etilmalônica

EIM – Erros Inatos do Metabolismo

ETHE1 – Proteína da Encefalopatia Etilmalônica 1

GSH – Glutationa Reduzida

H_2S – Sulfeto de Hidrogênio

HIF – Fator Induzido por Hipóxia

MEL – Melatonina

NAC – N-Acetilcisteína

SO – Sulfito Oxidase

TBA-RS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TRO – Trolox

1. INTRODUÇÃO

1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM), descritos pela primeira vez pelo médico inglês Sir Archibald E. Garrod em 1908, são um grupo de doenças genética e fenotipicamente heterogêneas causadas por mutações que levam à deficiência de uma proteína, geralmente uma enzima. Devido à deficiência, a enzima perde parcial ou totalmente a atividade, afetando uma determinada rota metabólica. O bloqueio dessa via metabólica tem como consequência o acúmulo de intermediários potencialmente tóxicos nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes, além de uma possível depleção de produtos essenciais ao organismo (Ferreira et al., 2021; Mak et al., 2013).

Embora sejam considerados raros, os EIM alcançam uma incidência de aproximadamente 1 a cada 500-1.000 recém-nascidos vivos. Mais de 1400 EIM já foram descritos até o presente momento, sendo que esse número vem crescendo a cada ano (Ferreira et al., 2021). Contudo, devido aos avanços no entendimento da etiologia molecular e bioquímica dos EIM através de técnicas desenvolvidas nos últimos anos, tem ocorrido um significativo progresso na detecção e tratamento dessas condições (Alfadhel et al., 2013; Beaudet et al., 2014; Scriver et al., 2001; Vernon, 2015). É de suma importância enfatizar que o diagnóstico precoce através da triagem neonatal, que aumenta a possibilidade de detecção dos EIM durante o período pré-sintomático, permite uma intervenção médica mais eficiente e possível melhora na história natural da doença (Vernon, 2015). Entretanto, como muitas dessas condições ainda carecem de testes diagnósticos específicos e sensíveis, além de tratamentos eficazes, torna-se importante o estudo mais aprofundado da fisiopatologia do dano tecidual dessas doenças, bem como de novos métodos diagnósticos e estratégias terapêuticas.

1.2. Catabolismo de aminoácidos sulfurados

A Figura 1 demonstra a rota de catabolismo dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína. Embora o enxofre pertença ao mesmo grupo do oxigênio na tabela periódica, sua eletronegatividade é muito inferior, sendo esta diferença responsável por algumas das propriedades distintas dos aminoácidos contendo enxofre. Neste contexto, a metionina e a cisteína são consideradas os principais

aminoácidos sulfurados, pois eles são 2 dos 20 aminoácidos canônicos que são incorporados nas proteínas (Brosnan; Brosnan, 2006).

A metionina é considerada um dos aminoácidos mais hidrofóbicos devido à substituição do oxigênio pelo enxofre em sua cadeia lateral. Essa característica faz com que a maior parte dos resíduos de metionina em proteínas globulares seja encontrada no núcleo hidrofóbico interno. Já em domínios de proteínas integrais, a metionina, na maioria das vezes, interage com a bicamada lipídica. Contudo, em algumas proteínas, uma fração dos resíduos de metionina fica na superfície exposta, sendo mais suscetíveis à oxidação, formando resíduos de sulfóxido de metionina. Alguns autores consideram esses resíduos de metionina em proteínas como antioxidantes endógenos (Brosnan; Brosnan, 2006; Levine; Mosoni; Berlett; Stadtman, 1996).

A cisteína, por sua vez, é um aminoácido polar que desempenha uma importante função na estrutura da proteína devido à capacidade de formar ligações dissulfeto inter e intra-cadeia, gerando a chamada cistina. Devido a este mecanismo, esse aminoácido age de maneira essencial na estrutura e no dobramento de proteínas. Além disso, tais proteínas contendo ligações dissulfeto são geralmente destinadas à exportação ou fazem parte de membranas plasmáticas.

O catabolismo da metionina à cisteína ocorre através de um ciclo de reações nas vias de transmetilação e transulfuração. Na via de transulfuração, as enzimas cistationina β-sintase (CBS) e γ-cistationase (CSE) são responsáveis por controlar o fluxo de enxofre entre seus intermediários homocisteína, cistationina e cisteína. Já o catabolismo da cisteína pode ocorrer através de duas vias: não-oxidativa e oxidativa. Na via não-oxidativa, há a formação de sulfeto de hidrogênio (sulfeto; H_2S), o qual pode ser produzido tanto através de reações catalisadas pelas enzimas CBS e CSE, como por exemplo, na conjugação de homocisteína e cisteína, quanto por uma via envolvendo as enzimas cisteína aminotransferase (CT) e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3-MST) (Figura 1).

O sulfeto de hidrogênio é então metabolizado na mitocôndria através de uma via contendo as enzimas ETHE1, sulfeto quinona oxidorredutase, tiossulfato enxofre transferase e sulfito oxidase (SO). A via inicia com a reação entre sulfeto e sulfito catalisada pela sulfeto quinona oxidorredutase (SQR), formando

tiossulfato. O enxofre do tiossulfato pode então ser transferido para uma molécula de glutationa (GSH) pela enzima tiossulfato enxofre transferase (TST), formando um perssulfeto de glutationa (GSSH). O perssulfeto pode sofrer a ação da ETHE1, a qual oxida esse composto a sulfito. O sulfito pode finalmente ser oxidado a sulfato pela sulfito oxidase (SO) ou ser convertido a tiossulfato pela ação da SQR (Figura 1). Diferentes mutações já foram relatadas no gene da ETHE1, causando a doença chamada de deficiência da ETHE1 ou encefalopatia etilmalônica (Tiranti *et al.*, 2006).

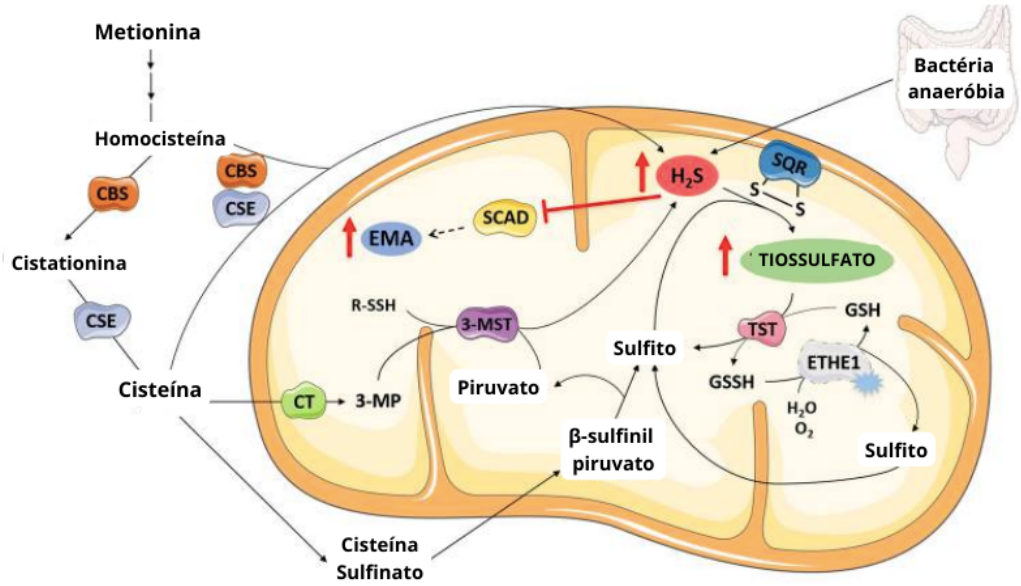


Figura 1. Rota catabólica dos aminoácidos metionina e cisteína. CBS: cistationina β-sintase; CSE: γ-cistationase; CT: cisteína aminotransferase; SCAD: desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta; SO: sulfito oxidase; SQR: sulfeto quinona oxidorredutase; TST: tiossulfato enxofre transferase; 3-MST: 3-mercaptopiruvato sulfotransferase. Adaptado de Grings et al. (2022).

1.3. Encefalopatia Etilmalônica

A encefalopatia etilmalônica (EE) é uma doença neurometabólica de herança autossômica recessiva causada por mutações no gene que codifica a enzima ETHE1. A ETHE1 é uma enzima do tipo enxofre dioxigenase de 30 kDa localizada na matriz mitocondrial que, como descrito anteriormente, está envolvida no metabolismo de aminoácidos sulfurados. A função da ETHE1 foi descrita somente em 2009 por Tiranti e colaboradores, que demonstraram que a sua atividade estava envolvida em uma via metabólica mitocondrial responsável pela detoxificação do sulfeto de hidrogênio. Além de atuar na

eliminação do sulfeto proveniente do catabolismo de aminoácidos sulfurados em diversos tecidos, essa enzima, bem como a rota na qual atua, desempenha um importante papel no epitélio intestinal, uma vez que grande parte do sulfeto produzido no organismo deriva do metabolismo de bactérias anaeróbicas residentes no lúmen intestinal. Nesse contexto, essa via metabólica atua na prevenção do acúmulo local de sulfeto a níveis tóxicos e do seu direcionamento ao fígado, bem como a outros órgãos através da veia porta (Di Meo et al., 2015).

A EE foi descrita primeiramente por Burlina e colaboradores (1991), em famílias italianas, porém, com o passar dos anos, observou-se que esta doença afeta predominantemente crianças das regiões mediterrâneas e da Península Arábica (Tiranti et al., 2004; Tiranti et al., 2006). A maioria dos pacientes acometidos por essa doença começam a apresentar os sintomas entre 3 a 6 meses de vida, sendo que a maioria morre em até 2 (dois) anos de vida (Pigeon *et al.*, 2009). A prevalência dessa doença ainda é desconhecida, porém até hoje estão descritos mais de 80 indivíduos confirmados por diagnóstico molecular. Contudo, acredita-se que a taxa de ocorrência dessa doença seja baixa devido ao difícil diagnóstico e também pela morte prematura dos pacientes (Di Meo; Lamperti; Tiranti, 1993).

A EE é caracterizada por encefalopatia progressiva, alterações psicomotoras, distonia, hipotonia, convulsões, microangiopatia, petéquias, acrocianose e diarreia crônica, resultando geralmente em morte precoce (Tiranti et al., 2004; Zafeiriou et al., 2007). Deve ser enfatizado que, além da diarreia, outras anormalidades intestinais como sufusões hemorrágicas de superfícies mesoteliais e mucosa intestinal são observadas (Di Meo et al., 2015; Zhou et al., 2020).

Bioquimicamente, os pacientes apresentam acúmulo de sulfeto e de tiossulfato em diversos tecidos, incluindo o cérebro, músculo esquelético e mucosa do cólon. Já foi evidenciado que os níveis plasmáticos de sulfeto nos pacientes podem chegar a cerca de 200 μM (níveis normais: < 5 μM) (Kabil e Banerjee, 2012; Tiranti et al., 2009; Viscomi et al., 2010). O H_2S inibe as atividades da citocromo *c* oxidase e da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta (SCAD). O bloqueio dessas enzimas leva ainda a níveis aumentados dos ácidos etilmalônico e metilsuccínico, acilcarnitinas C4 e C5 e lactato no plasma (Tiranti et al., 2009; Tavasoli et al., 2017; Zafeiriou et al., 2007).

Apesar de não haver tratamento totalmente eficaz para a EE com fármacos ou tratamento dietético, algumas drogas como a riboflavina, coenzima Q10, metronidazol e N-acetilcisteína (NAC) demonstraram uma melhora clínica em alguns casos (Kilic et al., 2017; Viscomi et al., 2010; Yis et al., 2015; Zafeiriou et al., 2007). A administração concomitante de metronidazol e NAC foi um dos tratamentos que apresentou melhores resultados, já que levou à melhora clínica expressiva de cinco pacientes afetados e diminuiu os níveis plasmáticos de tiossulfato, apresentando pouco efeitos adversos (Viscomi et al., 2010). Por fim, estudos evidenciaram que o transplante de fígado apresenta benefícios, estabilizando e até mesmo melhorando a condição clínica dos pacientes (Dionisi-Vici et al., 2016). Embora alguns tratamentos levem a uma melhora no prognóstico em alguns casos, é importante que estudos continuem sendo realizados com o intuito de desenvolver novas estratégias terapêuticas que possam trazer efeitos ainda mais eficazes ou aditivos aos tratamentos já existentes.

1.4. Fisiopatologia da EE

Embora bactérias anaeróbicas sejam responsáveis pela produção de grandes quantidades de sulfeto de hidrogênio e pacientes afetados por EE apresentem manifestações gastrointestinais importantes, a patogênese dessas anormalidades ainda não está totalmente elucidada. Já foi sugerido que o acúmulo de sulfeto tem importante toxicidade na mucosa do colón. Dados da literatura mostraram uma redução da atividade da citocromo *c* oxidase em colonócitos luminais de camundongos *Ethe1*$^{-/-}$, que é atribuída ao efeito do sulfeto (Di Meo et al., 2011). Além disso, conforme relatado em investigações sobre outras patologias, tais como como colite ulcerativa, uma deficiência na eliminação do sulfeto está possivelmente implicada no dano à mucosa colônica, que é característico de condições associadas à diarreia crônica grave (Tiranti et al., 2009; Roediger et al., 1987; Blau 2006).

Outros estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que o sulfeto também inibe a citocromo *c* oxidase em cérebro e músculo de camundongos *Ethe1*$^{-/-}$, e que a inibição crônica desse complexo leva à sua degradação (Di Meo et al., 2011). Ainda, o sulfeto induz a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial *in vitro* em cérebro e cerebelo de ratos (Cardoso et al., 2017). A

indução do poro também foi verificada em culturas de neurônios cerebelares (De Moura Alvorcem et al., 2019). Além disso, outras investigações em cérebro e músculo de ratos, fibroblastos de pacientes portadores da deficiência da ETHE1 e em camundongos *Ethe1*$^{-/-}$ também sugerem o envolvimento de distúrbios no estado redox nessa doença (Palmfeldt et al., 2011; Ritter et al., 2015; Schuck et al., 2010; Schuck et al., 2015; Viscomi et al., 2010).

1.5. Fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é o processo final do metabolismo produtor de energia na forma de ATP nos organismos aeróbicos. Todas as vias de catabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos podem convergir para essa etapa, na qual a energia proveniente da oxidação destes substratos energéticos e conservada na forma de equivalentes reduzidos (NADH e $FADH_2$) é utilizada para a síntese de ATP na mitocôndria. Neste processo, o NADH e $FADH_2$ doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (CTE), sendo esses transferidos sequencialmente através de complexos enzimáticos que, em eucariotos, estão ancorados na membrana mitocondrial interna. O aceptor final de elétrons é a molécula de O_2, a qual é reduzida à H_2O citocromo *c* oxidase (complexo IV). A transferência de elétrons é impulsionada por um crescente potencial redox existente entre os equivalentes reduzidos, os complexos da CTE e o O_2. Uma vez que o potencial de redução de cada componente da CTE está em um nível energético menor que o anterior, há a liberação de energia à medida que os elétrons são transferidos. Essa energia é utilizada pelos complexos I, III e IV para bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. A formação desse gradiente eletroquímico (força próton-motora) é o que possibilita a fosforilação do ADP a ATP à medida que os prótons, a fim de atingir o equilíbrio eletroquímico, retornam passivamente para a matriz através de um poro associado à ATP sintase (Lehninger; Nelson, & Cox, 2020).

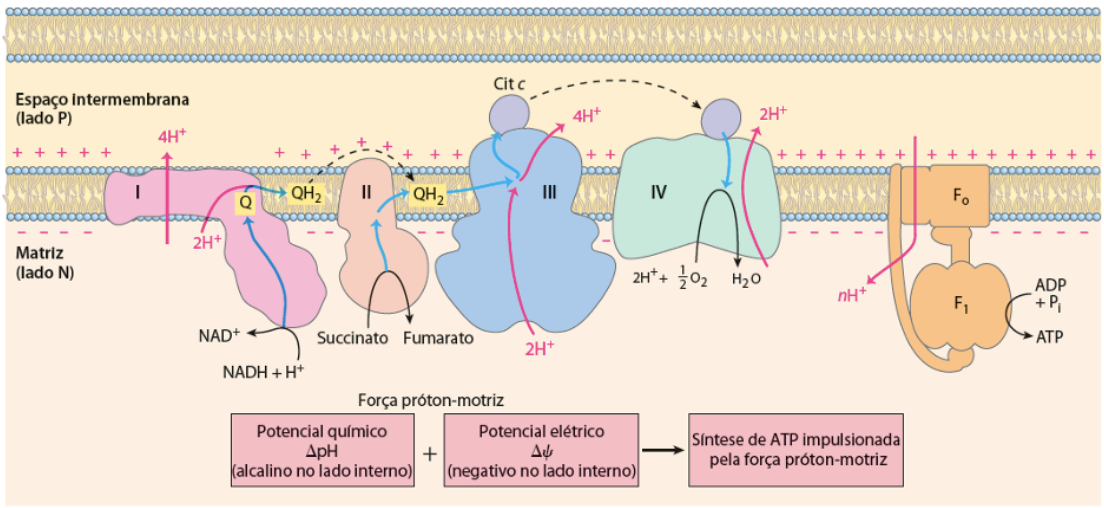


Figura 2. Representação da transferência de elétrons e bombeamento de prótons pelos complexos da cadeia respiratória mitocondrial com consequente síntese de ATP (NELSON, 2018).

1.6. Creatina cinase

O ciclo creatina-fosfocreatina medeia o sistema essencial de distribuição de energia em todas as células (Figura 3). Neste caso, a creatina serve como um tampão energético, transportando grupos N-fosforil de alta energia na forma de fosfocreatina. A fosfocreatina pode ser usada para produzir trifosfato de adenosina (ATP) em momentos e locais de maior uso de energia, como o citosol (Wallimann et al., 1992; Wallimann, 1994). A fosfocreatina tem maior facilidade de se propagar do que o ATP (Guimarães-Ferreira, 2014), sendo assim distribuída para áreas de maior necessidade. A regulação deste processo é mediada pela captação de creatina pelo transportador de creatina (CRT) e pela fosforilação reversível catalisada pelas isoenzimas mitocondrial e citosólica da creatina cinase (CK) (Wallimann et al., 1992, Wallimann, Tokarska-Schlattner, Schlattner, 2011; Bessman e Geiger, 1981). É importante enfatizar que deficiências na homeostase energética, incluindo a desregulação do ciclo da creatina-fosfocreatina, têm sido relatadas em doenças inflamatórias intestinais (Colgan et al., 2023).

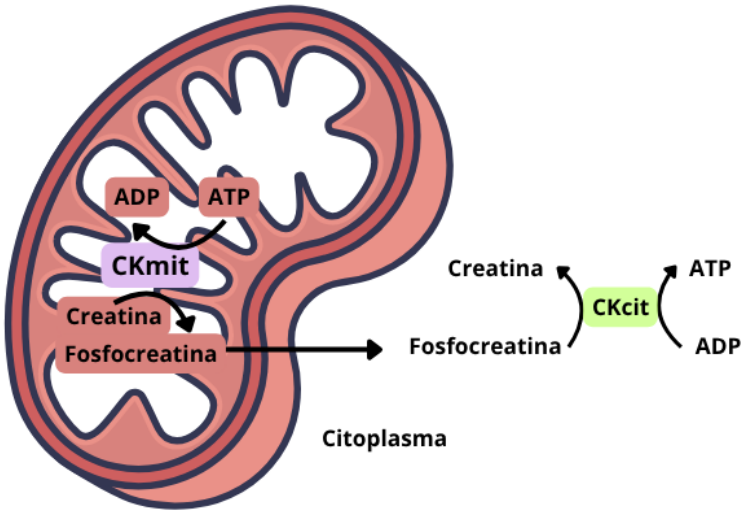


Figura 3. Representação do ciclo creatina-fosfocreatina. O ATP gerado na mitocôndria é utilizado para a síntese de fosfocreatina através da reação da creatina cinase (CK). A fosfocreatina é transportada para o citosol, onde passa reação inversa da CK, a fim de gerar ATP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Apesar de os pacientes acometidos pela EE apresentarem sintomas predominantemente neurológicos, a diarreia hemorrágica crônica associada a anormalidades da mucosa intestinal também é comumente observada causando um prejuízo na qualidade de vida. Visto que os mecanismos envolvidos nessas anormalidades ainda não estão estabelecidos, o objetivo desta tese foi avaliar os efeitos *in vitro* dos metabólitos acumulados na EE, o sulfeto e o tiossulfato, sobre o metabolismo energético e homeostase redox em intestino de ratos. Também determinamos os efeitos desses metabólitos sobre a viabilidade de células Caco-2.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos *in vitro* do sulfeto de hidrogênio e tiossulfato em intestino de ratos sobre os seguintes parâmetros de bioenergética.

a) Medida dos diferentes estados respiratórios determinados pelo consumo de oxigênio.

b) Medida da atividade total da enzima CK e de suas isoformas citosólica e mitocondrial.

c) Avaliação da influência da GSH, melatonina (MEL), trolox (TRO), apocinina e alopurinol sobre os efeitos causados pelo sulfeto de hidrogênio;

d) Determinação das concentrações de GSH, conteúdo de grupamentos sulfidrila, níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e formação de carbonilas.

Também investigamos os efeitos *in vitro* do sulfeto de hidrogênio e tiossulfato sobre a viabilidade de células Caco-2 através das técnicas de redução do MTT e da captação do vermelho neutro.

PARTE II

ARTIGO CIENTÍFICO

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados a seguir, na forma de artigo científico, o qual se encontra publicado na revista *Cell Biochemistry and Biophysics*.

Cell Biochemistry and Biophysics (2023) 81:683–695
https://doi.org/10.1007/s12013-023-01161-0

ORIGINAL PAPER

Disruption of Bioenergetics in the Intestine of Wistar Rats Caused by Hydrogen Sulfide and Thiosulfate: A Potential Mechanism of Chronic Hemorrhagic Diarrhea in Ethylmalonic Encephalopathy

Marina Rocha Frusciante[1] · Marian Flores Signori[1] · Belisa Parmeggiani[1] · Mateus Grings[1] · Julia Pramio[1] · Cristiane Cecatto[1] · Josyane de Andrade Silveira[1] · Mariana Rauback Aubin[2,3] · Larissa Aguiar Santos[2,3] · Ana Helena Paz[2,3] · Moacir Wajner[1,4,5] · Guilhian Leipnitz[1,2,4]

Accepted: 5 August 2023 / Published online: 17 August 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract
Ethylmalonic encephalopathy (EE) is a severe inherited metabolic disorder that causes tissue accumulation of hydrogen sulfide (sulfide) and thiosulfate in patients. Although symptoms are predominantly neurological, chronic hemorrhagic diarrhea associated with intestinal mucosa abnormalities is also commonly observed. Considering that the pathophysiology of intestinal alterations in EE is virtually unknown and that sulfide and thiosulfate are highly reactive molecules, the effects of these metabolites were investigated on bioenergetic production and transfer in the intestine of rats. We observed that sulfide reduced NADH- and $FADH_2$-linked mitochondrial respiration in the intestine, which was avoided by reduced glutathione (GSH) but not by melatonin. Thiosulfate did not change respiration. Moreover, both metabolites markedly reduced the activity of total, cytosolic and mitochondrial isoforms of creatine kinase (CK) in rat intestine. Noteworthy, the addition of GSH but not melatonin, apocynin, and Trolox (hydrosoluble vitamin E) prevented the change in the activities of total CK and its isoforms caused by sulfide and thiosulfate, suggesting a direct protein modification on CK structure by these metabolites. Sulfide further increased thiol content in the intestine, suggesting a modulation in the redox state of these groups. Finally, sulfide and thiosulfate decreased the viability of Caco-2 intestinal cells. Our data suggest that bioenergetic impairment caused by sulfide and thiosulfate is a mechanism involved in the gastrointestinal abnormalities found in EE.

Keywords Ethylmalonic encephalopathy · Hydrogen sulfide · Thiosulfate · Mitochondrial respiration · Creatine kinase · Intestine

PARTE III

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A EE é uma doença mitocondrial rara caracterizada por dano cerebral grave, microangiopatia e diarreia crônica. Na literatura, quase não há estudos sobre os distúrbios intestinais observados nos pacientes como, por exemplo, a diarreia hemorrágica crônica, constipação e dor abdominal, que são sintomas comumente relatados. Deve ser ressaltado aqui que há uma piora nesses sintomas quando os pacientes têm crises encefalopáticas agudas causadas, por exemplo, por infecções, que levam ao aumento ainda mais pronunciado nos níveis dos metabólitos acumulados (Grings et al., 2022). Dessa forma, o estudo dos mecanismos envolvidos nesses sintomas é de suma importância para o entendimento e tratamento desta doença, uma vez que se manifestam desde os primeiros dias de vida (Di Meo, Lamperti, Tiranti, 1993; Grings et al., 2022).

Dados da literatura já demonstraram alguns efeitos tóxicos do sulfeto em modelos da EE. Contudo, para o nosso conhecimento, apenas um estudo demonstrou efeitos desse metabólito em células intestinais. Foi verificado que o sulfeto reduz a atividade do citocromo *c* oxidase em colonócitos luminais de camundongos *Ethe1*$^{-/-}$ (Tiranti et al., 2009). Além disso, o tratamento para a EE é bastante limitado e baseado na administração de N-acetilcisteína, um precursor da GSH que atua como molécula sequestradora de sulfeto, e metronidazol, um bactericida com ação sobre bactérias geradoras de sulfeto (Tiranti et al., 2009). Tais observações nos levaram a hipotetizar que o acúmulo de sulfeto tem importante papel nas anormalidades gastrointestinais. Portanto, nesta tese, avaliamos os possíveis efeitos tóxicos do sulfeto e do seu derivado tiossulfato sobre a bioenergética e homeostase redox no intestino de ratos, bem como sobre a viabilidade de células Caco-2. Deve ser salientado aqui que níveis de lactato elevados são comumente encontrados nos pacientes, sugerindo disfunção bioenergética (Grings et al., 2022). Visto que estudos de nosso grupo mostraram ação benéfica de moléculas antioxidantes sobre os efeitos do sulfeto em outros tecidos (Grings et al., 2022), também investigamos os efeitos de diferentes antioxidantes sobre os efeitos deletérios provocados pelos metabólitos acumulados no intestino.

O sulfeto prejudicou a transferência de elétrons na cadeia respiratória bem como a fosforilação oxidativa no intestino de ratos. Especificamente, o sulfeto

reduziu o estado 3, que é estimulado por ADP, e a capacidade de transferência de elétrons na presença de substratos geradores de NADH (piruvato, glutamato e malato) e $FADH_2$ (succinato). Entretanto, o tiossulfato não foi capaz de alterar significativamente nenhum destes parâmetros. Esses resultados estão acordo com o estudo de Tiranti et al. (2009) que demonstrou a inibição da citocromo *c* oxidase em colonócitos de camundongos com a deficiência genética da ETHE1 (*Ethe1*$^{-/-}$). Nossos achados também corroboram achados anteriores de nosso e outros grupos que evidenciaram inibição da citocromo *c* oxidase e da respiração mitocondrial em outros tecidos de ratos, principalmente estruturas cerebrais (Grings et al., 2022). É importante salientar que a inibição da respiração mitocondrial foi vista também em fibroblastos de indivíduos diagnosticados com EE (Grings et al., 2019).

A mucosa intestinal é um ambiente metabólico complexo, onde, em condições fisiológicas, ocorre a absorção de nutrientes e também representa uma barreira protetora eficaz que impede a indução de processos inflamatórios frente à grande quantidade de microrganismos presentes na microbiota intestinal (Hall et al., 2023). Para que haja a manutenção dessas funções, há um elevado consumo de energia e uma regulação fina da função da barreira das células epiteliais, bem como o tráfego de células para dentro e para fora do tecido mucoso (Glover et al., 2013; Hall et al., 2023). Além disso, é importante comentar que as células epiteliais das vilosidades intestinais são mais dependentes da fosforilação oxidativa que as células da cripta (Rath, Moschetta, Haller, 2018). Considerando essas observações, sugerimos que as células epiteliais das vilosidades, principais responsáveis pela absorção de nutrientes, são mais expostas e, portanto, as mais prejudicadas pela ação do sulfeto. É também interessante considerar que a maior taxa de fosforilação oxidativa nas células das microvilosidades parece estar correlacionada com níveis elevados de PGC-1α, o principal regulador da biogênese mitocondrial e da síntese de componentes da cadeia respiratória (Rath, Moschetta, Haller, 2018).

Por outro lado, ainda podemos observar que uma dose baixa de sulfeto (10 μM) aumentou moderadamente a respiração LEAK na presença de substratos ligados ao NADH e $FADH_2$, e a capacidade ET na presença de succinato, sugerindo que este metabólito pode atuar também como um desacoplador, e não apenas como um inibidor da transferência de elétrons. Em

concordância com essa hipótese, Jia et al. (2020) demonstraram que o sulfeto causa desacoplamento mitocondrial em culturas primárias de microglia. Contudo, este estudo sugere que o desacoplamento mitocondrial seria um efeito benéfico do sulfeto, uma vez que induziu a ativação da via da AMPK (Jia et al., 2020). Mais estudos são necessários para investigar se o sulfeto também ativa a AMPK em células intestinais.

A seguir, estudamos os efeitos de alguns antioxidantes clássicos, como GSH e MEL, sobre o dano à respiração mitocondrial causado pelo sulfeto. O tratamento com GSH atenuou as alterações na respiração mitocondrial causadas pelo sulfeto, porém a MEL não se mostrou capaz do mesmo. Como já descrito na literatura, a GSH possui a capacidade de sequestrar sulfeto e eliminar diversas espécies reativas de oxigênio (ERO) (Halliwell e Gutteridge, 2015). Já a MEL apresenta atividade antioxidante por eliminar diferentes ERO, incluindo o radical hidroxila, o mais tóxico dentre os radicais livres já descritos (Miller et al., 2015; Waseem; Tabassum; Parvez, 2016). Essas observações sugerem que o sulfeto inibe a respiração mitocondrial no intestino através de sua interação direta com o complexo IV e não via ação das espécies reativas. Ainda, especulamos que esse efeito possa ser rápido, uma vez que, em nossa abordagem de estudo, o sulfeto foi adicionado logo no início do experimento (modelo *in vitro*). Contudo, não podemos excluir a hipótese de que o sulfeto possa gerar espécies reativas a longo prazo, e que essas também possam vir a prejudicar a cadeia respiratória (Grings et al., 2014). Neste contexto, modelos *in vivo* em roedores ou mesmo estudos *in vitro* em culturas de células possibilitarão a avaliação de efeitos a longo prazo do sulfeto.

Além disso, observamos que o sulfeto e o tiossulfato provocaram uma redução da atividade da CK total (CKt) e das isoformas mitocondrial (CKmit) e citosólicas (CKcit) no intestino de ratos. A enzima CK possui um papel importante no transporte e tamponamento energético, principalmente em tecidos com alta demanda energética como o cérebro e, em menor proporção, o intestino. A CK atua de forma reversível na transferência do grupo fosfato γ do ATP para a creatina, resultando na formação de ADP e fosfocreatina (Puurand et al., 2018).

Em tecidos com expressão elevada de CK foram observadas concentrações significativamente altas de fosfocreatina, o que possibilita a rápida regeneração de ATP. Contribuindo com os nossos achados, resultados

prévios mostraram que a CK exerce um papel fisiológico relevante nas células epiteliais intestinais em situações de dano ou estresse, sendo sua expressão regulada transcricionalmente pelo fator induzido por hipóxia (HIF) nessas células (Colgan et al., 2015; Puurand et al., 2018). Neste contexto, o HIF é um complexo proteico dimérico que atua na modulação de diversos processos celulares em resposta a condições de baixas concentrações de oxigênio ou hipóxia, incluindo adaptações metabólicas, diferenciação e crescimento celular, bem como a regulação da sobrevivência e apoptose (Ziello; Jovin; Huanga, 2007). Portanto, a CK tem sido considerada essencial para a integridade da barreira da mucosa intestinal durante episódios de inflamação intestinal, como por exemplo, ocorre na colite (Colgan et al., 2015; Glover et al., 2013), uma vez que o processo de recuperação das células epiteliais intestinais demanda elevado consumo energético, sendo acompanhado pela indução de HIF e aumento da expressão de CK (Colgan et al., 2015; Glover et al., 2013).

Ainda, reforçando nossa hipótese de que o acúmulo de sulfeto é tóxico para o intestino, observamos neste trabalho, que o metabólito reduziu a viabilidade das células intestinais Caco-2. Embora haja diferenças entre as células Caco-2 em relação às células epiteliais do cólon intestinal, a bioenergética mitocondrial tem sido amplamente estudada neste modelo de células cancerígenas (Libiad et al., 2019). Um estudo demonstrou uma redução da respiração mitocondrial causada pelo sulfeto em diferentes linhagens celulares de câncer de cólon humano, incluindo células Caco-2 (Libiad et al., 2019). Além disso, observou-se através deste mesmo estudo um aumento significativo na expressão de sulfeto quinona oxirredutase e ETHE1 em células Caco-2, indicando que as células epiteliais do cólon podem ser frequentemente expostas a altos níveis de sulfeto produzido por bactérias anaeróbicas presentes na mucosa intestinal (Libiad et al., 2019).

No entanto, observamos que a viabilidade celular foi reduzida apenas em períodos mais longos de exposição ao sulfeto (48 e 72 h). Sob essa perspectiva, a ausência de efeitos na viabilidade celular em 24 h pode ser explicada pela alta resistência das células tumorais a distúrbios bioenergéticos, o que possivelmente se dá pela sua alta capacidade adaptação do metabolismo energético para enfrentar danos. Entretanto, com períodos longos de exposição ao sulfeto, os mecanismos de resistência não são suficientes para evitar o dano.

Além do que foi mencionado anteriormente, verificamos que a GSH, um antioxidante protetor de grupos tiol de proteínas, atenuou ou preveniu os efeitos do sulfeto e do tiossulfato sobre a atividade da CKt, CKmit e CKcit no intestino de ratos. Em contraste, os outros antioxidantes que foram testados, incluindo MEL, APO e TRO, não foram capazes de alterar esses efeitos. Esses achados corroboram o resultado de que a diminuição da respiração mitocondrial provocada pelo sulfeto foi prevenida por GSH, mas não por MEL. Também estão de acordo com um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa que mostrou que a MEL e TRO não modificaram a redução da atividade de CK induzida por sulfeto no cérebro de ratos (Cardoso et al., 2017). Além disso, esses achados indicam que o sulfeto possivelmente seja um inibidor desta enzima no intestino ao interagir diretamente com grupos tiol presentes na estrutura da CK e sem a participação de ERO (Cardoso et al., 2017).

Também verificamos que o sulfeto aumentou os níveis de derivados com grupos tiol. Considerando que grupos tiol são frequentemente encontrados no centro catalítico de enzimas (Hansen; Roth; Winther, 2009; Thomas; Poland; Hanzatko, 1995), é possível especular que o aumento dos tióis induzido pelo sulfeto possa prejudicar ou modular a atividade de diferentes enzimas (Kumar & Banerjee, 2021). Esse resultado reforça ainda mais a possibilidade de que o sulfeto altera grupos tiol na estrutura da CK. Não podemos descartar ainda que o principal grupo aumentado pelo sulfeto sejam persulfetos (RSSH). Neste contexto, dados da literatura mostraram que persulfetos podem modular diferentes atividades enzimáticas (Percio et al., 2024; Gao et al., 2020). Portanto, é pertinente sugerir que, embora os danos causados sobre a respiração mitocondrial induzidos por sulfeto sejam devido à inibição do complexo IV da cadeia respiratória mediada por reações com os centros heme e cobre desse complexo (Nicholls et al., 2013), especulamos que a inibição da CK no intestino possa ocorrer devido à formação de persulfetos. De acordo com isso, um estudo publicado por Reddy et al. (2000) comprovou que o resíduo de cisteína (Cys283) do sítio ativo da CK do músculo esquelético é propenso à reação de tiolação, o que pode resultar em inativação enzimática. Além disso, Gao e colaboradores (2020) demonstraram que algumas enzimas do metabolismo energético passam por persulfidação em estados fisiológicos (situação normal) e que essa modificação pós-traducional pode evitar a desregulação metabólica celular.

Embora a persulfidação da CK não tenha sido relatada no trabalho de Gao et al. (2020), deve-se considerar que este estudo avaliou doses menores de sulfeto que o nosso estudo e que também usou diferentes tipos de células (hepatócitos humanos e células beta pancreáticas). Portanto, é coerente sugerir que as altas doses de sulfeto, similares às utilizadas em nossa abordagem experimental, possam causar essa modificação também na CK.

Outro ponto que deve ser observado é que é possível que o tiossulfato também possa provocar persulfidação, embora nenhum estudo tenha demonstrado esse efeito a partir desse metabólito. Essa hipótese é condizente com os dados de um estudo anterior do nosso grupo que mostraram que o ditiotreitol, um agente redutor de tiol, preveniu a diminuição da atividade da CK induzida por tiossulfato observada no cérebro de ratos (Grings et al., 2018). Entretanto, concentrações elevadas de espécies reativas também podem estar envolvidas neste cenário, uma vez que diversos estudos evidenciaram que tanto o tiossulfato quanto o sulfeto provocam dano oxidativo ao gerar espécies reativas de oxigênio e enxofre em roedores (Grings et al., 2018; de Moura Alvorcem et al., 2021; Grings et al., 2013; Jiang et al., 2016).

Atualmente, o tratamento da EE é baseado na administração de metronidazol e N-acetilcisteína (Viscomi et al., 2010) aliados a uma dieta restrita voltada à redução dos níveis de sulfeto. Este tratamento tem demonstrado uma melhora significativa nos sintomas e nos parâmetros bioquímicos de indivíduos com fenótipos atenuados da doença (Boyer et al., 2018). Sendo assim, acreditamos que nossos achados reforçam os benefícios da administração de NAC, que, por meio da geração de GSH, pode proteger a CK e a cadeia respiratória mitocondrial de possíveis danos causados pelos metabólitos acumulados na EE. Entretanto, a utilização da NAC como abordagem terapêutica para a EE requer cautela quanto ao regime de dosagem. Isso se deve ao fato de a NAC atuar como precursora da cisteína, a qual é um substrato para produção de sulfeto (Kohl, Mellis e Schwarz, 2019), podendo, assim, contribuir para o agravamento do quadro clínico em determinadas circunstâncias (Viscomi et al., 2010).

Deve ser comentado ainda que outros compostos sulfurados podem estar envolvidos nos efeitos observados nesta tese. Um artigo recente demonstrou níveis aumentados de sulfito e de seus derivados S-sulfocisteína e S-

sulfohomocisteína no plasma e urina dos pacientes com EE (Kožich et al., 2022). Foi sugerido que a produção de sulfito está aumentada a partir do metabolismo do precursor cisteína sulfinato, uma vez que a enzima ETHE1, outra fonte geradora de sulfito, está deficiente na doença (Figura 1). Visto que, em nosso modelo experimental, a enzima ETHE1 não está deficiente, sugerimos que o acúmulo do sulfito possa ocorrer tanto a partir de cisteína sulfinato quanto do tiossulfato produzido a partir do sulfeto de hidrogênio (Figura 1). Independente da via geradora de sulfito em nosso modelo, deve ser considerado que estudos já demonstraram que o sulfito inibe a cadeia respiratória mitocondrial e a atividade da CK em cérebro de ratos (Wyse et al., 2019). Assim, é possível que o sulfito também contribua para as alterações em intestino de ratos aqui observadas.

Uma importante limitação de nosso estudo é que os níveis de sulfeto e tiossulfato atingidos nos tecidos dos pacientes são desconhecidos. No entanto, é importante considerar que, em episódios de descompensação metabólica marcados por proteólise exacerbada, seus níveis aumentam significativamente em diferentes tecidos e líquidos biológicos dos pacientes. Além disso, visto que a enzima ETHE1 é mitocondrial, é possível que níveis ainda maiores sejam atingidos nessa organela, chegando a concentrações na faixa de micromolar, como usado em nosso trabalho. Outra limitação é que o tiossulfato pode gerar sulfeto de hidrogênio. Apesar de em nossos experimentos haver apenas uma incubação de curto período, é possível que sulfeto seja formado e que parte dos efeitos tóxicos do tiossulfato sejam induzidos pelo sulfeto.

Outro ponto que deve ser discutido é que diversos estudos têm demonstrado efeitos benéficos do sulfeto e do tiossulfato. Enquanto já foi visto que o tiossulfato possui propriedades antioxidantes (Duinkerken et al., 2021; Meijer et al., 2024), o sulfeto apresenta efeitos antioxidantes e de desacoplador da cadeia respiratória mitocondrial, dentre outros (Shemarova et al., 2021; Munteanu et al., 2025). No entanto, no contexto da EE, especulamos que ambos os metabólitos provavelmente se comportem como agentes pró-oxidantes devido às altas concentrações atingidas nos tecidos afetados dos pacientes com EE.

5. CONCLUSÃO

Os nossos achados mostram que o acúmulo de sulfeto de hidrogênio e tiossulfato é tóxico para o intestino, uma vez que ambos os metabólitos reduziram a atividade da CK em intestino de ratos, prejudicando a transferência celular de energia. Também foi verificado que apenas o sulfeto reduziu a respiração mitocondrial e modificou o estado redox. Ainda, esses metabólitos induziram efeitos citotóxicos em células Caco-2. Visto que as células Caco-2 são uma linhagem celular tumoral e, portanto, apresentam alta resistência a danos (Sambuy et al., 2005), podemos concluir que o sulfeto e o tiossulfato são metabólitos com elevada toxicidade. Além disso, os dados sugerem que o sulfeto é mais tóxico que o tiossulfato, uma vez que apenas o primeiro afetou a cadeia respiratória mitocondrial. Portanto, podemos presumir que esses mecanismos induzidos pelo sulfeto e tiossulfato contribuem para a fisiopatologia dos danos intestinais observados em pacientes com EE.

6. PERSPECTIVAS

Esse trabalho tem como perspectivas:

- Avaliar os efeitos *in vivo* da administração do sulfeto e tiossulfato sobre parâmetros de bioenergética, homeostase redox e bioegênese mitocondrial em intestino de ratos.

- Avaliar os efeitos *in vitro* do sulfeto e tiossulfato sobre parâmetros de bioenergética e de homeostase redox em células Caco-2 e em outras linhagens celulares como HT29 e LoVo (linhagens de câncer de cólon).

- Avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* de um pré-tratamento com NAC sobre os efeitos do sulfeto e tiossulfato em intestino de ratos.

7. REFERÊNCIAS

Alfadhel, M., Al-Thihli, K., Moubayed, H., Eyaid, W., Al-Jeraisy, M. Drug treatment of inborn errors of metabolism: a systematic review. **Archives of Disease in Childhood,** 98(6), 454-61, 2013.

Beaudet, A., Clegg, J., Tobin, J. Review of utility values for economic modeling in type 2 diabetes**. Value in Health,** 17(4), 462–470, 2014.

Bessman, S.P., Geiger, P.J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. **Science**. 211, 448-452, 1981.

Bickel, H. Early Diagnosis and Treatment of Inborn Errors of Metabolism. **Enzyme,** 38(1–4), 14–26, 1987.

Blau, N., Hoffmann, G. F., Leonard, J. V. (Eds.). Physician's Guide to the Treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases. **Springer-Verlag,** 2006.

Boyer, M., Sowa, M., Di Meo, I., Eftekharian, S., Steenari, M. R., Tiranti, V., Abdenur, J. E. Response to medical and a novel dietary treatment in newborn screen identified patients with ethylmalonic encephalopathy. **Molecular Genetics and Metabolism**, 124(1), 57–63, 2018.

Brosnan, J. T., Brosnan, M. E. The sulfur-containing amino acids: an overview. **The Journal of Nutrition**, 136(6 Suppl), 1636S–1640S., 2006.

Burlina, A., Zacchello, F., Dionisi-Vici, C., Bertini, E., Sabetta, G., Bennet, M.J., Hale, D.E., Schmidt-Sommerfeld, E., Rinaldo, P. New clinical phenotype of branched-chain acyl-CoA oxidation defect. **The Lancet**, 14;338(8781):1522-3., 1991.

Cardoso, G.M.F., Pletsch, J.T., Parmeggiani, B., Grings, M., Glanzel, N.M., Bobermin, L.D., Amaral, A.U., Wajner, M., Leipnitz, G. 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 Molecular Basis of Disease**, 1863(9):2192-2201, 2017.

Colgan S.P., Wang, R.X., Hall, C.H.T., Bhagavatula, G., Lee, J.S. Revisiting the “starved gut” hypothesis in inflammatory bowel disease. **Immunometabolism** (**Cobham)**. 5: e0016, 2023.

Colgan, S. P., Curtis, V. F., Lanis, J. M., Glover, L. E. Metabolic regulation of intestinal epithelial barrier during inflammation. **Tissue Barriers**, 3, 1–2, 2015.

de Moura Alvorcem, L., Britto, R., Parmeggiani, B., Glanzel, N.M., da Rosa-Junior, N.T., Cecatto, C., Bobermin, L.D., Amaral, A.U., Wajner, M., Leipnitz, G. Evidence that thiol group modification and reactive oxygen species are involved

in hydrogen sulfide-induced mitochondrial permeability transition pore opening in rat cerebellum. **Mitochondrion**, 47,141-150 2019.

de Moura Alvorcem, L., Britto, R., Cecatto, C., Roginski, A. C., Rohden, F., Scholl, J. N., Guma, F. C. R., Figueiró, F., Amaral, A. U., Zanatta, G., Seminotti, B., Wajner, M., Leipnitz, G. Ethylmalonic acid impairs bioenergetics by disturbing succinate and glutamate oxidation and induces mitochondrial permeability transition pore opening in rat cerebellum. **Journal of Neurochemistry,** 158(2), 262–281, 2021.

Di Meo, I., Lamperti, C., Tiranti, V. Ethylmalonic Encephalopathy. 2017 Sep 21. In: Adam, M.P., Feldman, J., Mirzaa, G.M., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Amemiya A., editors. **GeneReviews®** [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle,1993.

Di Meo, I., Lamperti, C., Tiranti, V. Chronic exposure to sulfide causes accelerated degradation of cytochrome c oxidase in ethylmalonic encephalopathy. **Antioxidants & Redox Signaling**, 15(2), 353–362, 2011.

Di Meo, I., Lamperti, C., Tiranti, V. Mitochondrial diseases caused by toxic compound accumulation: from etiopathology to therapeutic approaches. **EMBO Molecular Medicine**, 7(10), 1257–1266, 2015.

Dionisi-Vici, C., Shteyer, E., Niceta, M., Rizzo, C., Pode-Shakked, B., Chillemi, G., Bruselles, A., Semeraro, M., Barel, O., Eyal, E., Kol, N., Haberman, Y., Lahad, A., Diomedi-Camassei, F., Marek-Yagel, D., Rechavi, G., Tartaglia, M., Anikster, Y. Expanding the molecular diversity and phenotypic spectrum of glycerol 3-phosphate dehydrogenase 1 deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 39(5), 689–695, 2016.

Duinkerken, C.W., de Weger, V.A., Dreschler, W.A., van der Molen, L., Pluim, D., Rosing, H., Nuijen, B., Hauptmann, M., Beijnen, J.H., Balm, A.J.M., de Boer, J.P., Burgers, J.A., Marchetti, S., Schellens, J.H.M., Zuur, C.L. Transtympanic Sodium Thiosulfate for Prevention of Cisplatin-Induced Ototoxicity: A Randomized Clinical Trial. **Otology & Neurotology**, 42(5), 678-685, 2021.

Ferreira, C.R., Rahman, S., Keller, M., Zschocke, J., ICIMD Advisory Group. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 44,164–177, 2021.

Gao, X. H., Li, L., Parisien, M., Wu, J., Bederman, I., Gao, Z., Krokowski, D., Chirieleison, S. M., Abbott, D., Wang, B., Arvan, P., Cameron, M., Chance, M., Willard, B., Hatzoglou, M. Discovery of a redox thiol switch: implications for cellular energy metabolism. **Molecular and Cellular Proteomics**, 5, 852–870, 2020.

Glover, L. E., Bowers, B. E., Saeedi, B., Ehrentraut, S. F., Campbell, E. L., Bayless, A. J., Dobrinskikh, E., Kendrick, A. A., Kelly, C. J., Burgess, A., Miller, L., Kominsky, D. J., Jedlicka, P., Colgan, S. P. Control of creatine metabolism by HIF is an endogenous mechanism of barrier regulation in colitis. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, 49, 19820–19825, 2013.

Grings, M., Moura, A. P., Amaral, A. U., et al. Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease,** 1842(8), 1413–1422, 2014.

Grings, M., Moura, A. P., Parmeggiani, B., Marcowich, G. F., Amaral, A. U., Wyse, A. T. S., Wajner, M., Leipnitz, G. Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency. **Gene**, 531(2), 191–198, 2013.

Grings, M., Seminotti, B., Karunanidhi, A., Ghaloul-Gonzalez, L., Mohsen, A. W., Wipf, P., Palmfeldt, J., Vockley, J., Leipnitz, G. ETHE1 and MOCS1 deficiencies: Disruption of mitochondrial bioenergetics, dynamics, redox homeostasis and endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in patient fibroblasts. **Scientific Reports**, 9(1), 12651–1263 2019.
Grings, M., Parmeggiani, B., Moura, A.P., de Moura Alvorcem, L., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Leipnitz, G. Evidence that Thiosulfate Inhibits Creatine Kinase Activity in Rat Striatum via Thiol Group Oxidation. **Neurotoxicity Research**, 34(3):693-705, 2018.

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**, 42(3), 565–575, 2022.

Guimarães-Ferreira, L. Role of the phosphocreatine system on energetic homeostasis in skeletal and cardiac muscles. **Einstein** (Sao Paulo). 12: 126-131, 2014.

Hall, C.H.T., Lanis, J.M., Dowdell, A.S., Murphy, E.M., Bhagavatula, G., Neuhart, R.M., Yenugudhati Vijaya Sai, K., Colgan, S.P. Fundamental role for the creatine kinase pathway in protection from murine colitis. **Mucosal Immunology**,16(6), 817-825, 2023.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 5th Edition, Oxford University Press, New York, 2015.

Hansen, R. E., Roth, D., Winther, J. R. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 106(2), 422–427, 2009.

Jia, J., Wang, Z., Zhang, M., Huang, C., Song, Y., Xu, F., Zhang, J., Li, J., He, M., Li, Y., Ao, G., Hong, C., Cao, Y., Chin, Y. E., Hua, Z. C., Cheng, J. SQR mediates therapeutic effects of H2S by targeting mitochondrial electron transport to induce mitochondrial uncoupling. **Science Advances**, 6(35), 2020.

Jiang, J., Chan, A., Ali, S., Saha, A., Haushalter, K. J., Lam, W. L., Glasheen, M., Parker, J., Brenner, M., Mahon, S. B., Patel, H. H., Ambasudhan, R., Lipton, S. A., Pilz, R. B., Boss, G. R. Hydrogen sulfide-mechanisms of toxicity and development of an antidote. **Scientific Reports**, 6, 20831–22840, 2016.

Kabil, O., Banerjee, R. Characterization of patient mutations in human persulfide dioxygenase (ETHE1) involved in H2S catabolism. **Journal of Biological Chemistry**, 287, 44561-7, 2012.

Kilic, M., Dedeoğlu, Ö., Göçmen, R., Kesici, S., Yüksel, D. Successful treatment of a patient with ethylmalonic encephalopathy by intravenous N-acetylcysteine. **Metabolic Brain Disease**, 32(2):293-296, 2017.

Kohl, J. B., Mellis, A. T., Schwarz, G. Homeostatic impact of sulfite and hydrogen sulfide on cysteine catabolism. **British Journal of Pharmacology**, 176, 554–570, 2019.

Kožich, V., Schwahn, B.C., Sokolová, J., Křížková, M., Ditroi, T., Krijt, J., Khalil, Y., Křížek, T., Vaculíková-Fantlová, T., Stibůrková, B., Mills, P., Clayton, P., Barvíková, K., Blessing, H., Sykut-Cegielska, J., Dionisi-Vici, C., Gasperini, S., García-Cazorla, Á., Haack, T.B., Honzík, T., Ješina, P., Kuster, A., Laugwitz, L., Martinelli, D., Porta, F., Santer, R., Schwarz, G., Nagy, P. Human ultrarare genetic disorders of sulfur metabolism demonstrate redundancies in H_2S homeostasis. **Redox Biology**, 58, 102517, 2022.

Kumar, R., Banerjee, R. Regulation of the redox metabolome and thiol proteome by hydrogen sulfide**. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 56(3): 221–235, 2021.

Lehninger, T. M., Nelson, D. L., Cox, M. M. **Princípios de Bioquímica.** 8ª Edição, Ed. Artmed, 2020.

Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., Stadtman, E. R. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93(26), 15036–15040, 1996.

Libiad, M., Vitvitsky, V., Bostelaar, T., Bak, D.W., Lee, H.J., Sakamoto, N., Fearon, E., Lyssiotis, C.A., Weerapana, E., Banerjee, R. Hydrogen sulfide perturbs mitochondrial bioenergetics and triggers metabolic reprogramming in colon cells. **Journal of Biological Chemistry**, 294(32), 12077-12090, 2019.

Mak, C. M., Lee, H. C., Chan, A. Y. W., Lam, C. W. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: Review and update. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, 50(3), 142–162, 2013.

Meijer, A.J.M., Diepstraten, F.A., Ansari, M., Bouffet, E., Bleyer, A., Fresneau, B., Geller, J.I., Huitema, A.D.R., Kogner, P., Maibach, R., O'Neill, A.F., Papadakis, V., Rajput, K.M., Veal, G.J., Sullivan, M., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Brock, P.R. Use of Sodium Thiosulfate as an Otoprotectant in Patients With Cancer

Treated With Platinum Compounds: A Review of the Literature. **Journal of Clinical Oncology**, 42(18), 2219-2232, 2024.

Miller, E., Morel, A., Saso, L., Saluk, J. Melatonin redox activity. Its potential clinical applications in neurodegenerative disorders. **Current Topics in Medicinal Chemistry,** 15(2), 163–169, 2015.

Munteanu, C., Galaction, A.I., Onose, G., Turnea, M., Rotariu, M. The Janus Face of Oxidative Stress and Hydrogen Sulfide: Insights into Neurodegenerative Disease Pathogenesis. **Antioxidants (Basel),** 14(3), 360, 2025.

Nicholls, P., Marshall, D. C., Cooper, C. E., Wilson, M. T. Sulfide inhibition of and metabolism by cytochrome c oxidase. **Biochemical Society Transactions**, 41(5), 1312–1316, 2013.

Palmfeldt, J., Vang, S., Stenbroen, V., Pavlou, E., Baycheva, M., Buchal, G., Monavari, A.A., Augoustides-Savvopoulou, P., Mandel, H., Gregersen, N. Proteomics reveals that redox regulation is disrupted in patients with ethylmalonic encephalopathy. **Journal of Proteome Research** , 6;10(5):2389-96, 2011.

Percio, A., Cicchinelli, M., Masci, D., Summo, M., Urbani, A., Greco, V. Oxidative Cysteine Post Translational Modifications Drive the Redox Code Underlying Neurodegeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Antioxidants (Basel)**, 23;13(8):883, 2024.

Pigeon, N., Campeau, P. M., Cyr, D., Lemieux, B., Clarke, J.T. Clinical heterogeneity in ethylmalonic encephalopathy. **The Journal of Child Neurology**, 24, n. 8, p. 991-996, Aug 2009.

Puurand, M., Tepp, K., Klepinin, A., Klepinina, L., Shevchuk, I., Kaambre, T. Intracellular energy-transfer networks and high resolution respirometry: a convenient approach for studying their function. **International Journal of Molecular Sciences**, 19, 2933–2951, 2018.

Rath, E., Moschetta, A., Haller, D. Mitochondrial function - gatekeeper of intestinal epithelial cell homeostasis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** , 15(8):497-516, 2018.

Reddy, S., Jones, A. D., Cross, C. E., Wong, P. S., Van Der Vliet, A. Inactivation of creatine kinase by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue. **Biochemical Journal,** 347(Pt 3), 821–827, 2000.

Ritter, L., Kleemann, D., Hickmann, F.H., Amaral, A.U., Sitta, Â., Wajner, M., Ribeiro, C.A. Disturbance of energy and redox homeostasis and reduction of Na+,K+-ATPase activity provoked by in vivo intracerebral administration of ethylmalonic acid to young rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1852(5):759-67, 2015.

Roediger, W. E., Moore, J., Babidge, W. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, *42*(8), 1571–1579, 1987.

Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A., Zucco, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell Biology and Toxicology**, 21(1):1-26, 2005.

Schuck, P.F., Busanello, E.N., Moura, A.P., Tonin, A.M., Grings, M., Ritter, L., Vargas, C.R., da Costa Ferreira, G., Wajner, M. Promotion of lipid and protein oxidative damage in rat brain by ethylmalonic acid. **Neurochemical Research**, 35(2):298-305, 2010.

Schuck, P.F., Milanez, A.P., Felisberto, F., Galant, L.S., Machado, J.L., Furlanetto, C.B., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Streck, E.L., Ferreira, G.C. Brain and muscle redox imbalance elicited by acute ethylmalonic acid administration. **PLoS One**, 26,10(5), 2015.

Scriver, C. R., et al. Molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency: clinical and biochemical aspects. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Vogelstein, B., eds. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill; p. 3163–3177, 2001.

Shemarova, I., Nesterov, V., Emelyanova, L., Korotkov, S. Mitochondrial mechanisms by which gasotransmitters (H_2S, NO and CO) protect cardiovascular system against hypoxia. **Frontiers in Bioscience-Scholar,** 3:13(2):105-130, 2021.

Shen, S., Vagner, S., Robert, C. Persistent cancer cells: the deadly survivors. **Cell**, 183(4), 860–874, 2020.

Tavasoli, A.R., Rostami, P., Ashrafi, M.R., Karimzadeh, P. Neurological and Vascular Manifestations of Ethylmalonic Encephalopathy. **Iranian Journal of Child Neurology**, 11, 57-60,2017.

Thomas, J. A., Poland, B., Honzatko, R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** 319(1), 1–9, 1995.

Tiranti, V., D'Adamo, P., Briem, E., Ferrari, G., Mineri, R., Lamantea, E., Mandel, H., Balestri, P., Garcia-Silva, M.T., Vollmer, B., Rinaldo, P., Hahn, S.H., Leonard, J., Rahman, S., Dionisi-Vici, C., Garavaglia, B., Gasparini, P., Zeviani, M. Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. **Journal of Human Genetics**. 74, 239-52, 2004.

Tiranti, V., Briem, E., Lamantea, E., Mineri, R., Papaleo, E., De Gioia, L., Forlani, F., Rinaldo, P., Dickson, P., Abu-Libdeh, B., Cindro-Heberle, L., Owaidha, M.,

Jack, R.M., Christensen, E., Burlina, A., Zeviani, M. ETHE1 mutations are specific to ethylmalonic encephalopathy. **J Med Genet.** 43, 340-6, 2006.

Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, I., Mineri, R., Tiveron, C., Levitt, M.D., Prelle, A., Fagiolari, G., Rimoldi, M., Zeviani, M. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. **Nature Medicine**. 15, 200-5, 2009.

Vernon, H.J. Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy. **JAMA Pediatrics**. 169, 778-82, 2015.

Viscomi, C., Burlina, B. A., Dweikat, I., Savoiardo, M., Lamperti, C., Hildebrandt, T., Tiranti, V., Zeviani, M. Combined treatment with oral metronidazole and N-acetylcysteine is effective in ethylmalonic encephalopathy. **Nature Medicine,** 16(8), 869–871, 2010.

Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. **Amino Acids**.40: 1271-1296, 2011.

Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., Nicolay K., Eppenberger H.M.Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochemical Journal**, 281: 21-40, 1992.

Wallimann T.B. Bioenergetics. Dissecting the role of creatine kinase. **Current Biology**, 4: 42-46, 1994.

Waseem, M., Tabassum, H., Parvez, S. Melatonin modulates permeability transition pore and 5-hydroxydecanoate induced KATP channel inhibition in isolated brain mitochondria. **Mitochondrion**, 31, p. 1-8, 2016.

Wyse ATS, Grings M, Wajner M, Leipnitz G. The Role of Oxidative Stress and Bioenergetic Dysfunction in Sulfite Oxidase Deficiency: Insights from Animal Models. **Neurotoxicity Research**, 35(2),484-494, 2019.

Yis, U., Polat, İ., Karakaya, P., Ayanoğlu, M., Hiz, A.S. Importance of acrocyanosis in delayed walking. **Journal of Pediatric Neurosciences**, 10, 80-1, 2015.

Zafeiriou, D. I.; Augoustides-Savvopoulou, P.; Haas, D.; Smet, J., Triantafyllou, P., Vargiami, E., Tamiolaki, M., Gombakis, N., van Coster, R., Sewell, A.C., Vianey-Saban, C., Gregersen, N. Ethylmalonic encephalopathy: clinical and biochemical observations. **Neuropediatrics**, 38,2, 8-82, 2007.

Zhou, G. P., Qu, W., Zhu, Z. J., Sun, L. Y., Wei, L., Zeng, Z. G., Liu, Y. Compromised therapeutic value of pediatric liver transplantation in ethylmalonic

encephalopathy: a case report. **World Jouurnal of Gastroenterology**, *26*(40), 6295–6303, 2020.

Ziello, J. E., Jovin, I. S., Huanga, Y. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. **Yale Journal of Biology and Medicine**, 80(2), 51–60, 2007.