

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

**EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS HIDROXILADOS DE CADEIA LONGA**  
**ACUMULADOS NA DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE**  
**HIDROXIACIL-COA DE CADEIA LONGA SOBRE PARÂMETROS DE**  
**BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL EM FÍGADO DE RATOS**

**FERNANDA HERMES HICKMANN**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER**

**Porto Alegre, 2015**

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

**EFEITOS DOS ÁCIDOS GRAXOS HIDROXILADOS DE CADEIA LONGA**  
**ACUMULADOS NA DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE**  
**HIDROXIACIL-COA DE CADEIA LONGA SOBRE PARÂMETROS DE**  
**BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL EM FÍGADO DE RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

**FERNANDA HERMES HICKMANN**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER**

**Porto Alegre, 2015**

CIP - Catalogação na Publicação

Hickmann, Fernanda Hermes

Efeitos dos ácidos graxos hidroxilados de cadeia longa acumulados na deficiência da desidrogenase de hidroxiacil-coa de cadeia longa sobre parâmetros de bioenergética mitocondrial em fígado de ratos / Fernanda Hermes Hickmann. -- 2015.

82 f.

Orientador: Moacir Wajner.

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, 2015.

1. Erros inatos do metabolismo. 2. Bioenergética. 3. Mitocôndria. 4. Fígado. 5. Cálcio. I. Wajner, Moacir, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me proporcionar formação gratuita e de ótima qualidade.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPERGS, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica por todo o profissionalismo e competência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Moacir Wajner por todos os ensinamentos, paciência, incentivo e compreensão.

À Cris, meu braço direito nesse trabalho, por nunca ter medido esforços para me ajudar, por entender e dividir os momentos bons e ruins e por toda amizade.

Ao Alexandre, meu segundo braço direito, por ter me ajudado a compreender as mitocôndrias teoricamente e praticamente e na escrita do artigo.

Aos bolsistas Dani e Wagner, por todas as preparações mitocondriais e pela amizade.

À Ânge, pela ajuda nos experimentos iniciais, conselhos e amizade.

Ao César pela base científica e pelos conhecimentos de laboratório.

À Carol, Clarissa e Bianca pelo apoio, ajuda e principalmente pela amizade.

Ao Mateus, Belisa e Alana pela amizade.

Ao meu namorado Fábio, por todo amor, carinho e apoio.

À minha família, pais e irmão, por todo amor e incentivo e por confiarem em mim.

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	<b>1</b>
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
I.1. INTRODUÇÃO.....	5
I.1.1. Oxidação de Ácidos Graxos.....	5
I.1.2. Defeitos de Oxidação de Ácidos Graxos.....	6
I.1.3. Deficiência da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia longa hidroxilada (LCHAD).....	7
I.1.3.1. Ácidos graxos acumulados em pacientes coma deficiência da LCHAD.....	10
I.1.3.2. Fisiopatologia nas deficiências da LCHAD/MTP.....	10
I.1.4 Fosforilação Oxidativa e Homeostase Mitocondrial.....	12
I.1.5 Papel da Mitocôndria na Homeostase de Cálcio.....	16
I.2. OBJETIVOS.....	20
I.2.1. Objetivo Geral.....	20
I.2.2 Objetivo Específicos.....	20
<b>PARTE II</b> .....	<b>21</b>
<b>PARTE III</b> .....	<b>59</b>
III.1 DISCUSSÃO.....	60
III.2 CONCLUSÕES.....	65
III.3 PERSPECTIVAS.....	66
III.4 REFERÊNCIAS.....	67

## **PARTE I**

### ***Introdução e Objetivos***

## RESUMO

A deficiência da desidrogenase de hidroxilacil-coa de cadeia longa (LCHAD) é um erro inato do metabolismo de ácidos graxos. Pacientes acometidos apresentam acúmulo de ácidos graxos hidroxilados de cadeia longa no sangue e tecidos. A sintomatologia é bastante variada, sendo que os pacientes apresentam hepatopatia e cardiomiopatia severa, assim como retinopatia, hipotonia, neuropatia periférica, atraso no desenvolvimento e na fala, letargia e convulsões. Considerando que a patofisiologia do dano hepático encontrado nos pacientes com deficiência da LCHAD não está esclarecida, o presente trabalho teve como objetivo investigar *in vitro* os efeitos dos ácidos 3-hidroxitetradecanoico (3HTA) e 3-hidroxipalmítico (3HPA) sobre importantes parâmetros da bioenergética mitocondrial, tais como os parâmetros respiratórios estado 3, estado 4, razão de controle respiratório (RCR) e estado desacoplado (U), bem como o potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ), inchamento, capacidade de retenção de  $Ca^{2+}$  mitocondrial e estado redox do NAD(P) em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos jovens. Os ácidos monocarboxílicos encontrados em maiores concentrações nos pacientes, 3HTA e 3HPA inibiram a respiração estimulada por ADP (estado 3), a desacoplada, o RCR, diminuíram o  $\Delta\Psi_m$  e o conteúdo de NAD(P)H e, em contraste, aumentaram a respiração lenta (estado 4) em mitocôndrias utilizando glutamato/malato ou succinato como substratos. Além disso, o inibidor competitivo do translocador de nucleotídeo adenina (ANT) atractilósídeo atenuou o aumento no estado 4 provocado pelo 3HTA. Esses dados indicam que o 3HTA e o 3HPA atuam como inibidores metabólicos e desacopladores da fosforilação no fígado. Também verificamos que baixas concentrações desses ácidos graxos hidroxilados causam uma diminuição significativa no  $\Delta\Psi_m$  e no conteúdo de NAD(P)H na presença de  $Ca^{2+}$ . 3HTA e 3HPA também diminuíram a capacidade de retenção de  $Ca^{2+}$  e induziram inchamento em mitocôndrias. Os efeitos induzidos por 3HTA foram totalmente prevenidos pelos inibidores clássicos do poro de transição de permeabilidade (PTP) ciclosporina A e ADP, assim como pelo rutênio vermelho, um inibidor da captação de  $Ca^{2+}$ , indicando abertura do PTP. Ademais, ditiotreitól e N-etilmaleimida não foram capazes de prevenir estes efeitos, descartando a oxidação dos grupamentos tióis do PTP como mecanismo de sua abertura. Finalmente, verificamos que o ácido dicarboxílico 3-hidroxitetradecanodioico (3HTDA), que também se acumula na deficiência da LCHAD e que é um análogo do 3HTA, não alterou os parâmetros de bioenergética mitocondrial. Em conjunto, nossos dados demonstram que os principais ácidos graxos monocarboxílicos hidroxilados de cadeia longa acumulados na deficiência da LCHAD prejudicam a homeostase energética mitocondrial em fígado. Presumimos que esse mecanismo possa explicar, pelo menos em parte, a disfunção hepática característica dos pacientes acometidos por essa doença.

## ABSTRACT

Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency is an inborn error of metabolism of fatty acid oxidation. Affected patients present blood and tissue accumulation of the 3-hydroxy fatty acids. Clinical presentation is characterized by a wide variety of symptoms, including severe hepatopathy and cardiomyopathy, as well as retinopathy, hypotonia, peripheral neuropathy, speech and developmental delay, lethargy and seizures. Considering that the pathophysiology of the hepatic damage found in LCHAD-deficient patients is not yet clear, the aim of the present work was to investigate the *in vitro* effects of 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) on important parameters of mitochondrial bioenergetics, namely the respiratory parameters state 3, state 4, respiratory control ratio (RCR) and state uncoupled (U), as well as mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), swelling,  $Ca^{2+}$  retention capacity and NAD(P) redox state in isolated liver mitochondria from young rats. The monocarboxylic acids found at higher concentrations in LCHAD-deficient patients, 3HTA and 3HPA, inhibited the ADP-stimulated (state 3) and uncoupled respiration, decreased  $\Delta\Psi_m$  and NAD(P)H content and, in contrast, increased resting (state 4) respiration in mitochondrial preparations supported by glutamate plus malate or succinate. Furthermore, the competitive inhibitor of adenine nucleotide translocase (ANT) atractyloside, attenuated the 3HTA-induced increase of state 4 respiration. These data indicate that 3HTA and 3HPA act as metabolic inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation in the liver. We also verified that low concentrations of these hydroxyl fatty acids caused a strong decrease of  $\Delta\Psi_m$  and NAD(P)H content in the presence of  $Ca^{2+}$ . 3HTA and 3HPA also reduced  $Ca^{2+}$  retention capacity and induced swelling in mitochondria. The effects induced by 3HTA were totally prevented by the classical mitochondrial permeability transition (MPT) inhibitors cyclosporin A and ADP, as well as by ruthenium red, a  $Ca^{2+}$  uptake blocker, indicating MPT pore opening. Furthermore, dithiothreitol and *N*-ethylmaleimide were not able to prevent these effects, making unlikely an oxidation of thiol groups of the MPT pore as a mechanism of its opening. Finally, the dicarboxylic 3-hydroxytetradecanodioic acid (3HTDA), which also accumulates in LCHAD deficiency and is an analogue of 3HTA, did not alter mitochondrial bioenergetics parameters.

Taken together, our data demonstrate that the major monocarboxylic long chain fatty acids accumulating in LCHAD deficiency disrupt energy mitochondrial homeostasis in the liver. It is proposed that this pathomechanism may explain at least in part the hepatic alterations characteristic of the affected patients.



## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\Delta\Psi_m$  – potencial de membrana mitocondrial
- Alm – alameticina
- ATC – atractilosídeo
- CCCP – cianeto de carbonila de meta-clorofenil-hidrazona
- CoA – coenzima A
- CoQ – coenzima Q
- CTE – cadeia transportadora de elétrons
- CsA – ciclosporina A
- GDP – guanosina difosfato
- EIM – erros inatos do metabolismo
- LCHAD – desidrogenase de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia longa
- LDL – lipoproteína de baixa densidade
- MCAD – desidrogenase de acil-CoA de cadeia média
- MCU – sistema uniporte de  $Ca^{2+}$
- MTP – proteína trifuncional mitocondrial
- NMDA – N-metil D-aspartato
- Pi – fosfato inorgânico
- PTP – poro de transição de permeabilidade
- RCR – índice de controle respiratório
- RR – rutênio vermelho
- SCAD – desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta
- SCHAD – desidrogenase de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia curta
- VDAC – canal de ânions voltagem-dependente
- VLCAD – desidrogenase de acil-CoA de cadeia muito longa

## **I.1 INTRODUÇÃO**

### **I.1.1. Oxidação de Ácidos Graxos**

A oxidação de ácidos graxos é a principal fonte de energia nos músculos esquelético e cardíaco, bem como no fígado que os utiliza em maior quantidade em situações de catabolismo, como jejum prolongado e doenças. Além disso, ácidos graxos também tem um papel importante na sinalização celular, influenciando atividades enzimáticas, expressão gênica e homeostase de certos íons (Graber et al., 1994).

Ácidos graxos são oxidados por um processo mitocondrial repetitivo que consiste em quatro reações enzimáticas, resultando na remoção sequencial de unidades de acetil-CoA (Scriver, 2001). Primeiramente, ácidos graxos de cadeia longa plasmáticos são transportados ativamente através da membrana plasmática e então ativados a ésteres de acil-CoA e transesterificados a acil carnitinas para serem transferidas através da membrana mitocondrial pelas enzimas carnitina palmitoil transferase 1 (CPT 1) e 2 (CPT 2) em conjunto com a carnitina-acilcarnitina translocase (CT). Dentro da mitocôndria, os ácidos graxos são reesterificados a ésteres de acil-CoA e seguem para a espiral de  $\beta$ -oxidação. As quatro reações do ciclo da  $\beta$ -oxidação são catalizados pelas acil-CoA desidrogenases (ACADs), enoil-CoA hidratases, L-3-hidroxiacil-CoA desidrogenases e 3-cetoacil-CoA tiolase (Figura 1). Esse processo gera equivalentes reduzidos que são transferidos para a cadeia transportadora de elétrons (CTE). Dentro da espiral, cada passo é catalisado por enzimas específicas para o tamanho de cadeia do ácido graxo a ser catabolizado. Como um conjunto, o processo de  $\beta$ -oxidação inclui pelo menos 25 enzimas e proteínas de transporte.

Foi descrito por Wang e colaboradores (2010) que as proteínas responsáveis pela oxidação de ácidos graxos na mitocôndria são funcionalmente e fisicamente associadas e com a CTE. Isto se mostra importante, considerando que essa associação otimiza o processo de transferência de energia, aumentando a sua eficiência (Rinaldo et al., 2002; Wang et al., 2010).

Uma vez mobilizados do tecido adiposo, ácidos graxos de cadeia longa são transportados na circulação primeiramente ligado a albumina. Durante períodos de jejum, os ácidos graxos se tornam o principal combustível para produção de ATP no fígado, músculos cardíaco e esquelético. O cérebro não utiliza diretamente ácidos

graxos, porém utiliza corpos cetônicos que são produzidos a partir da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos no fígado.

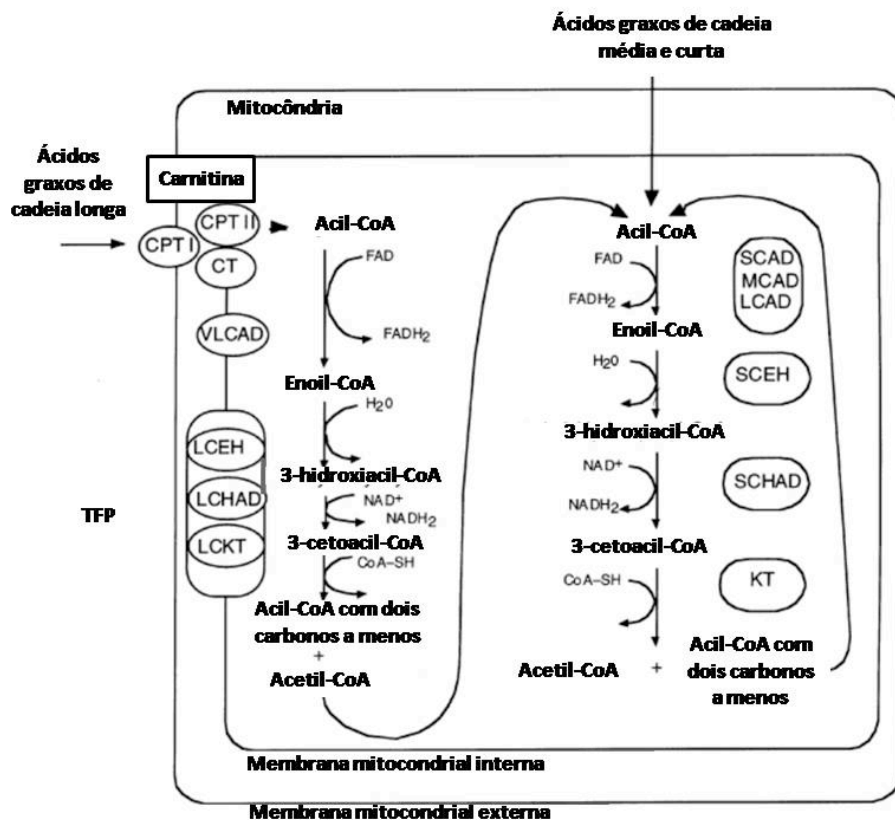


Figura 1. Esquema da oxidação de ácidos graxos mitocondrial. Carnitina palmitoil transferases 1 (CPT1) e 2 (CPT2); carnitina-acilcarnitina translocase (CT); desidrogenase das acilas-CoA de cadeia muito longa (VLCAD); proteína trifuncional mitocondrial (MTP); hidratase de enoil-CoA de cadeia longa (LCEH); desidrogenase de hidroxiacil-CoA de cadeia longa (LCHAD); tiolase de cetoacil-CoA de cadeia longa (LCKT); desidrogenase de acil-CoA de cadeia longa (LCAD); desidrogenase de acilas-CoA de cadeia média (MCAD); desidrogenase de acilas-CoA de cadeia curta (SCAD); hidratase de enoil-CoA de cadeia curta (SCEH); desidrogenase de hidroxiacil-CoA de cadeia curta (SCHAD); cetotiolase (KT). Adaptada de Tyni e Pihko (1999).

### I.1.2. Defeitos de Oxidação de Ácidos Graxos

Como vimos anteriormente, a  $\beta$ -oxidação mitocondrial de ácidos graxos é a principal fonte de energia para a síntese de ATP, principalmente em períodos de estresse metabólico e depleção de glicogênio decorrente de um jejum prolongado. Este processo gera acetil-CoA e ATP. A rota de oxidação dos ácidos graxos é complexa e inclui

muitos passos: captação celular de ácidos graxos, ativação dos mesmos a ésteres acil-CoA, trans-esterificação a acilcarnitinas, translocação através da membrana mitocondrial, re-esterificação a acil-CoA, e a espiral da beta-oxidação mitocondrial, que fornece elétrons para flavoproteínas transferidoras de elétrons e acetil-CoA. Cada etapa da espiral de oxidação é catalisada por enzimas específicas para o comprimento da cadeia carbônica do ácido graxo (Lieberman M. e Marks, A.D., 2011).

Na década de setenta foram descritos os primeiros EIM causados por defeitos na oxidação dos ácidos graxos em pacientes com astenia ou rabdomiólise induzida por exercício. Atualmente, já estão descritas pelo menos 23 diferentes tipos deste grupo de doenças, incluindo defeitos no transporte de carnitina na membrana plasmática, nas enzimas carnitina palmitoiltransferase I e II, carnitina/acilcarnitina translocase, nas desidrogenases de acilas-CoA de cadeia muito longa (VLCAD), média (MCAD) e curta (SCAD), na 2,4-dienoil-CoA redutase e nas desidrogenases de acilas-CoA de cadeia longa hidroxilada (LCHAD) e curta hidroxilada (SCHAD), bem como na proteína trifuncional mitocondrial (MTP) (Roe e Ding, 2001).

Acredita-se que a prevalência dessas doenças seja subestimada, visto que seu diagnóstico depende da detecção dos metabólitos acumulados por métodos sofisticados e equipamentos de alto custo que poucos laboratórios possuem (Walker, 1994). Além disso, devido à semelhança do quadro clínico, uma parte considerável dos pacientes afetados por defeitos de oxidação de ácidos graxos é diagnosticada erroneamente como síndrome de morte súbita da infância, infecção bacteriana aguda (septicemia), síndrome de Reye, fígado gorduroso da gravidez ou síndrome de vômito cíclico (Rinaldo et al., 1998).

### **I.1.3. Deficiência da Desidrogenase de Acilas-CoA de Cadeia Longa Hidroxilada (LCHAD)**

Ácidos graxos de cadeia longa provenientes da dieta ou mobilizados a partir do tecido adiposo durante a lipólise são degradados inicialmente pela desidrogenase de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCAD). As três reações enzimáticas subsequentes são catalisadas pela MTP.

A MTP é um complexo enzimático que se apresenta na forma de um heterooctâmero ( $\alpha_4\beta_4$ ) associada a membrana mitocondrial interna. A subunidade  $\alpha$  contém as

atividades enzimáticas de 2-enoil-CoA hidratase e de desidrogenase de acilas-CoA de cadeia longa hidroxilada (LCHAD), enquanto a subunidade  $\beta$  contém a atividade 3-cetoacil-CoA tiolase (LKAT) (Ushikubo et al. 1996). Mutações nas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  podem levar à deficiência da MTP com redução das três atividades enzimáticas. Contudo, uma mutação isolada no domínio catalítico de uma dessas três enzimas resulta em uma deficiência isolada da atividade enzimática.

A deficiência da LCHAD é a mais comum dentre as deficiências isoladas do complexo MTP. Recentemente também foram identificados dois pacientes com a deficiência isolada da LKAT (Sander et al. 2005; Das et al. 2006). Juntas as deficiências LCHAD/MTP ocorrem com uma prevalência estimada de 1:110.000 nascidos vivos (Das et al., 2000).

A deficiência da LCHAD é uma desordem autossômica recessiva que geralmente se apresenta do nascimento até os três anos de idade. Essa enzima catalisa o terceiro passo da oxidação mitocondrial dos ácidos graxos de cadeia longa, convertendo as 3-hidroxiacilas-CoAs em suas 3-cetoacil-CoAs correspondentes. Essa doença metabólica foi primeiramente descrita em 1990 (Hagenfeldt et al, 1990) e desde então vários casos foram relatados destacando uma sintomatologia clínica variada.

Durante situações de estresse metabólico como infecções ou exercício prolongado, a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo ultrapassa a capacidade da mitocôndria em oxidá-los devido ao defeito enzimático, fazendo com que os mesmos se acumulem em uma quantidade maior nos tecidos dos afetados. Concomitantemente, as manifestações neurológicas, hepáticas e musculares dos pacientes afetados se acentuam, indicando que esses compostos são tóxicos. A hipoglicemia hipocetótica é um dos achados laboratoriais mais proeminentes nestes pacientes, além de encefalopatia, coma, convulsão, letargia, microcefalia, cardiomiopatia, disfunção hepática, alterações musculares, rabdomiólise, retinopatia ou morte súbita (Onkenhout et al., 1995; Rinaldo et al., 1998; Roe and Ding, 2001; Spiekerkoetter U., 2004). Exames laboratoriais durante esses episódios de descompensação também mostram altos níveis de lactato e elevada concentração de creatina quinase e transaminases no sangue, indicando disfunção mitocondrial e alterações da função hepática. Além disso, ocorre a excreção de grandes quantidades dos ácidos graxos dicarboxílicos hidroxilados de cadeia longa na urina. No plasma são encontradas concentrações elevadas de 3-hidroxiacilcarnitinas e ácidos graxos hidroxilados de cadeia longa, como os ácidos 3-

hidroxidodecanoico (3HDA), 3-hidroxitetradecanoico (3HTA) e 3-hidroxi palmítico (3HPA). O diagnóstico pode ser ratificado por dosagem da atividade da enzima deficiente em fibroblastos dos pacientes (Wanders et al., 1992).

O tratamento consiste em evitar períodos de jejum, especialmente durante infecções e outras situações com catabolismo acelerado, associado à dieta hipercalórica com redução de ácidos graxos de cadeia longa e suplementação com triglicerídeos de ácidos graxos de cadeia média (Spiekerkoetter et al., 2009).

Pouco se sabe sobre a fisiopatologia do dano tecidual apresentado por esses pacientes. No entanto, há duas hipóteses para explicar apresentação precoce dos sintomas (período neonatal) e a alta mortalidade na deficiência da LCHAD: a toxicidade dos metabólitos acumulados e a depleção energética devido ao bloqueio da  $\beta$ -oxidação e a hipoglicemia.

Neste contexto, há alguns estudos descrevendo efeitos tóxicos *in vitro* de ácidos graxos e seus derivados hidroxilados em modelos animais. Foi demonstrado que as hidroxiacilas-CoA de cadeia longa inibem a síntese de ATP, o translocador de nucleotídeos de adenina, além de transportadores mitocondriais de ácidos dicarboxílicos, bem como atividades enzimáticas dos complexos da cadeia respiratória em preparações mitocondriais de fígado de ratos (Ventura et al., 2007). Além disso, os 3-hidroxiácidos de cadeia longa foram capazes de alterar parâmetros respiratórios, tais como estados 3 e 4 da respiração mitocondrial, bem como o potencial de membrana e o conteúdo de NAD(P)H em preparações mitocondriais de cérebro e de coração de ratos jovens (Tonin et al., 2010a, 2013). Também foi observado que os 3-hidroxiácidos acumulados nas deficiências da MTP e da LCHAD induzem estresse oxidativo *in vitro* em córtex cerebral de ratos jovens (Tonin et al., 2010b). Finalmente, foi demonstrado que os ácidos graxos hidroxilados de cadeia longa agem sinergicamente com o  $Ca^{2+}$ , induzindo a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (PTP) e prejudica a homeostase energética mitocondrial no cérebro de ratos (Tonin et al., 2014). Esses achados sugerem que a acidemia láctica descrita em pacientes afetados por essas doenças possa estar relacionada a um prejuízo na produção de ATP na mitocôndria devido ao aumento intramitocondrial de acilas-CoA de cadeia longa hidroxilada (Ventura et al., 1998; den Boer et al., 2002).

### **I.1.3.1. Ácidos graxos acumulados em pacientes com Deficiência da LCHAD**

As concentrações de ácidos graxos hidroxilados de cadeia longa e seus derivados estão aumentadas nos tecidos dos pacientes afetados por deficiência de LCHAD durante fases assintomáticas da doença. Entretanto, principalmente durante os períodos de crise, as concentrações desses ácidos graxos encontram-se muito aumentados no sangue e nos outros tecidos, e são excretados em grande quantidade na urina dos pacientes (Costa et al., 2000; Jones et al., 2000).

Testes de laboratório durante episódios sintomáticos revelam hipoglicemia hipocetótica, altos níveis de lactato, pequeno aumento dos níveis de amônia, bem como de transaminases e creatina cinase no plasma. O perfil de acilcarnitinas no sangue dos pacientes afetados apresenta concentrações aumentadas de acilcarnitinas de cadeia longa, 3-hidroxiacilcarnitinas de cadeia longa, bem como de ácidos graxos monocarboxílicos e dicarboxílicos hidroxilados de cadeia longa. Também é observada a excreção de grandes quantidades de ácidos dicarboxílicos derivados hidroxilados, como os ácidos 3-hidroxi-decanedioico e 3-hidroxi-tetradecanedioico. A detecção desses ácidos graxos de cadeia longa hidroxilada em sangue e urina permite a diferenciação destas doenças de outros defeitos da  $\beta$ -oxidação mitocondrial. Contudo, a análise do perfil das acil-carnitinas e dos ácidos graxos acumulados na urina não permite a diferenciação das deficiências da LCHAD e da MTP. A confirmação do diagnóstico só pode ser feita por dosagem das enzimas em fibroblastos dos pacientes ou por análise mutacional.

### **I.1.3.2. Fisiopatologia nas Deficiências LCHAD/MTP**

Há duas hipóteses para explicar a pouca idade em que ocorre o início da apresentação dos sintomas e a alta mortalidade nas deficiências da LCHAD e da MTP: a toxicidade dos ésteres de acil-CoA de cadeia longa hidroxilada pode contribuir para o aumento da mortalidade por causar distúrbios no ritmo cardíaco, falência respiratória e/ou hepática. Além disso, o bloqueio na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa resulta em uma quase completa inabilidade em sintetizar corpos cetônicos e produzir ATP a partir de ácidos graxos de cadeia longa que é a mais abundante forma de armazenamento de energia no homem (Nelson e Cox, 2000).

Neste contexto, há alguns estudos descrevendo efeitos tóxicos *in vitro* de ácidos graxos e seus derivados hidroxilados, a maioria desses estudos está relacionada a um

bloqueio em distintos passos do metabolismo energético. Foram demonstrados que acilas-CoA de cadeia longa hidroxilada inibiram a síntese de ATP (Ventura et al. 2005), o translocador de nucleotídeos de adenina, além de transportadores mitocondriais de ácidos dicarboxílicos, bem como enzimas da cadeia respiratória em preparações mitocondriais de fígado de ratos (Ventura et al. 2007). Esses achados reforçam a ideia de que a acidemia láctica descrita em pacientes afetados por essas doenças se deva a um possível distúrbio na fosforilação oxidativa causado pelo aumento intramitocondrial de acil-CoA de cadeia longa hidroxilada (Ventura et al., 1998; den Boer et al., 2002).

Outro fator que contribui para a deficiência energética apresentada por estes pacientes é a inibição da gliconeogênese, já que este processo depende da energia gerada pela lipólise e pela  $\beta$ -oxidação, tanto para o fornecimento de glicerol que pode ser convertido em glicose, quanto para o suprimento energético propriamente dito para que tal processo ocorra. Como uma consequência do defeito da  $\beta$ -oxidação e da depleção energética, um aumento compensatório na produção de glicose seria esperado. Contudo, isto não é observado. Há, no entanto, um aumento da lipólise, aumentando a disponibilidade de ácidos graxos em geral, que potencialmente podem ser metabolizados ou então se tornarem tóxicos (Wanders et al. 1999). Assim, o aumento da lipólise compensaria por algumas horas a demanda energética, porém aumentando o risco de efeitos tóxicos mediados por esses ácidos graxos.

Além disso, a síntese diminuída de corpos cetônicos durante o jejum ocorre nas deficiências das proteínas LCHAD e MTP devido à baixa disponibilidade de acetil-CoA, fazendo com que aumente a importância do consumo da glicose sanguínea como fonte de energia celular, ocasionando hipoglicemia nos pacientes. Outra consequência da não-utilização dos ácidos graxos de cadeia longa hidroxilada na síntese de corpos cetônicos é o acúmulo de acil-CoA de ácido graxo de cadeia longa hidroxilada dentro das mitocôndrias. Eleva-se então a razão acil-CoA:CoA, causando a inibição das enzimas piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, que utilizam coenzima A como substrato. Assim, ocorre diminuição da conversão do piruvato a acetil-CoA e diminuição na velocidade do ciclo do ácido cítrico, visto que a síntese do citrato e a conversão do  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil-CoA também estão diminuídas (Nelson e Cox, 2000).

A hipoglicemia apresentada por pacientes tem sido sugerida com o principal mecanismo de dano cerebral nas deficiências da LCHAD e MTP. Entretanto,



considerando que coma e edema cerebral também ocorrem em pacientes afetados por essas doenças que apresentam níveis normais de glicose, sugere que os metabólitos acumulados poderiam estar envolvidos na patogenia do dano neurológico (Egidio et al, 1989).

#### **I.1.4. Fosforilação Oxidativa e Homeostase Mitocondrial**

A energia proveniente da oxidação de carboidratos, lipídios e aminoácidos é convertida à ligações de fosfato de alta energia, ATP, pelo processo chamado de fosforilação oxidativa. A maioria desta energia é inicialmente conservada na forma de coenzimas reduzidas aceptoras de elétrons, como NADH e FADH<sub>2</sub>, e estes são posteriormente oxidados pela cadeia transportadora de elétrons, aonde os elétrons são transportados até o oxigênio molecular, que é reduzido a H<sub>2</sub>O (Lieberman M. e Marks, A.D., 2011). Em eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias, mais especificamente na cadeia respiratória, e é responsável pela maior parte da energia obtida pela célula. As mitocôndrias são organelas envoltas por uma membrana externa, facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, e por uma membrana interna, impermeável à maioria das moléculas polares, incluindo ATP, ADP, Pi, piruvato e H<sup>+</sup> (Nelson e Cox, 2000). Entretanto, o processo de fosforilação oxidativa necessita de um transporte rápido e contínuo de muitas destas moléculas, o que requer transportadores específicos para as mesmas, as proteínas translocases. Grande parte dessas proteínas translocases são movidas pelo gradiente eletroquímico, seja pelo potencial de membrana ou pelo gradiente de prótons (Lieberman M. e Marks, A.D., 2011).

A mitocôndria possui ainda o poro de transição de permeabilidade mitocondrial, chamado PTP. Ele é formado basicamente pelo translocador de nucleotídeos adenina, ANT, pelo canal de ânions voltagem-dependente (VDAC) e pela ciclofilina D. O acúmulo de cálcio intramitocondrial, excesso de fosfato ou ainda espécies reativas de oxigênio podem causar a abertura do poro, enquanto que o potencial de membrana e alta concentração de ATP no lado citosólico do poro inibem sua abertura. Com a abertura do poro, ocorre entrada de ânions e cátions dentro da matrix, inchamento mitocondrial e o dano sofrido pela mitocôndria se torna irreversível (Lieberman M. e Marks, A.D., 2011).

A cadeia respiratória é composta por vários complexos enzimáticos e uma coenzima lipossolúvel, a coenzima Q (CoQ) ou ubiquinona (Di Donato, 2000). O

complexo I, conhecido como NADH desidrogenase ou NADH: ubiquinona oxidorreductase, transfere os elétrons do NADH para a ubiquinona. O complexo II (succinato desidrogenase) reduz a ubiquinona com elétrons do FADH<sub>2</sub> provenientes da oxidação do succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico. O complexo III, citocromo *bc<sub>1</sub>* ou ubiquinona-citocromo *c* oxidoreductase, catalisa a redução do citocromo *c* a partir da ubiquinona reduzida. Na parte final da cadeia de transporte de elétrons, o complexo IV (citocromo *c* oxidase) catalisa a transferência de elétrons de moléculas reduzidas de citocromo *c* para O<sub>2</sub>, formando H<sub>2</sub>O. São necessárias quatro moléculas de citocromo *c* para reduzir completamente uma molécula de O<sub>2</sub>. Todos esses complexos possuem grupamentos prostéticos específicos para desempenharem o papel de aceptores e doadores de elétrons (Abeles, Frey e Jencks, 1992). No entanto, a membrana mitocondrial interna é impermeável às moléculas de NADH ou a FADH<sub>2</sub>, necessitando sistemas de transferência desses equivalentes reduzidos do citosol para a matriz mitocondrial. Nesse contexto, a oxidação do NADH formado no citosol é possibilitada por sistemas chamados lançadeiras que transferem elétrons do NADH do citosol para a matriz, por meio de moléculas capazes de serem transportadas através da membrana mitocondrial interna. Existem duas lançadeiras para este fim, designadas de lançadeira do glicerol-3-fosfato e lançadeira de malato/aspartato, conforme ilustra a figura 2. Uma vez reduzidas na matriz, as moléculas de NADH e FADH<sub>2</sub> podem ceder elétrons para o complexo I ou para a CoQ, respectivamente, suprindo a cadeia respiratória (Nelson e Cox, 2000).

O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, através dos complexos I, III e IV, gerando um potencial de membrana. Assim, cria-se um gradiente eletroquímico transmembrana que pode ser utilizado por um quinto complexo protéico, a ATP sintase, para a síntese de ATP. Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos está acoplada ao processo de fosforilação do ADP, ou seja, quando o potencial de membrana é dissipado pelo fluxo de prótons a favor do gradiente eletroquímico, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase, que atua como uma bomba de prótons ATP-dependente (Nelson e Cox, 2000).

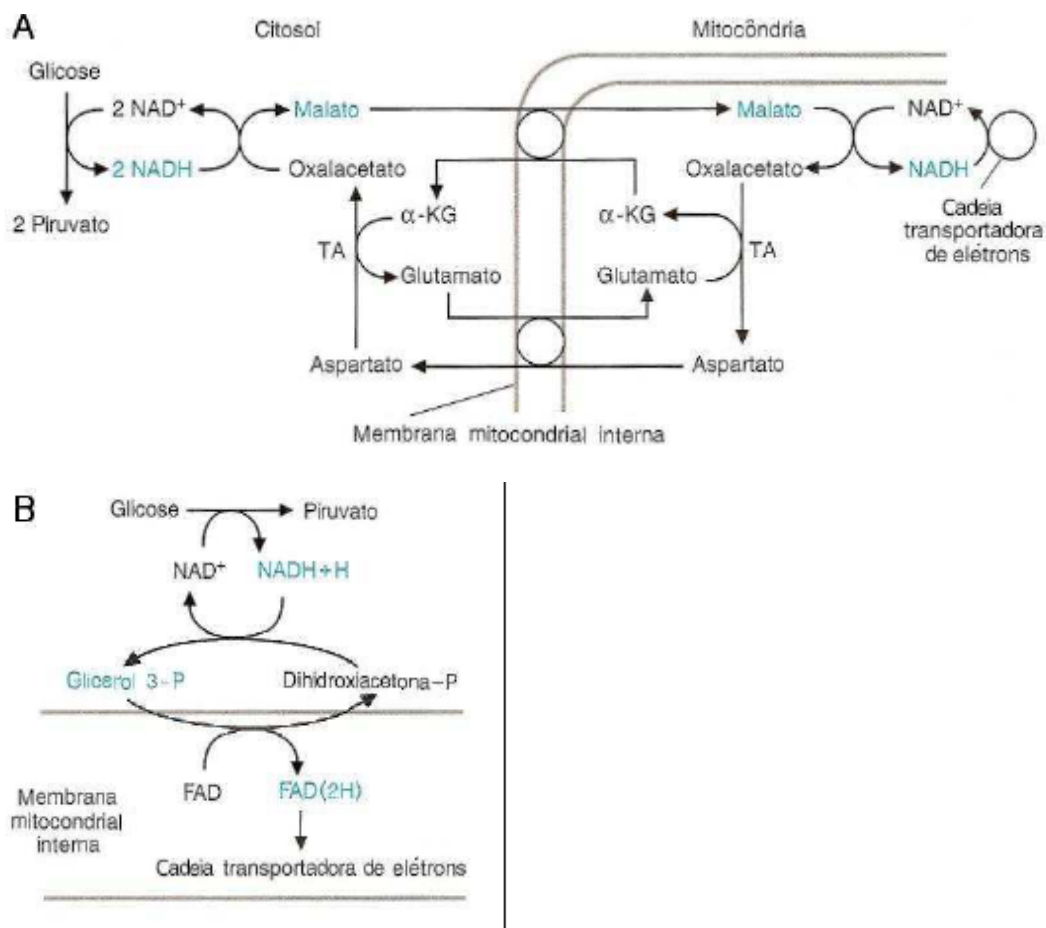


Figura 2. Lançadeiras do malato (A) e do glicerol-3-P (B) (Adaptado de Smith, Marks e Lieberman, 2005).

Desse modo, a respiração mitocondrial pode ser verificada através da medida do consumo de O<sub>2</sub>. Apesar de que essa medida determina diretamente apenas a velocidade de uma única reação (transferência final de elétrons para O<sub>2</sub>), muitas informações sobre outros processos mitocondriais podem ser obtidos simplesmente pela adaptação das condições de incubação, tornando o processo de análise significativo no consumo final de oxigênio. Vários passos podem ser investigados, incluindo o transporte de substratos através da membrana mitocondrial, a atividade das desidrogenases, a atividade dos complexos da cadeia respiratória, o transporte de nucleotídeos de adenina pela membrana mitocondrial, a atividade da ATP sintase e a permeabilidade da membrana mitocondrial a H<sup>+</sup> (Nicholls e Ferguson, 2002). Experimentalmente, pode-se dividir a respiração mitocondrial em 5 estágios, conforme ilustra a figura 3. No entanto, apenas os parâmetros estados 3 e 4 são comumente utilizados. O estado 3 representa o consumo de oxigênio quando as mitocôndrias, em um meio contendo substrato oxidável, são

expostas a ADP, estimulando o consumo de  $O_2$  e produzindo ATP (estado fosforilante). O estado 4 reflete o consumo de  $O_2$  após as mitocôndrias já terem depletado todo o ADP disponível, reduzindo a velocidade da respiração (estado não-fosforilante) (Nicholls e Ferguson, 2002). A transdução de energia entre a cadeia respiratória e o gradiente eletroquímico de  $H^+$  é bem regulada, sendo que um pequeno desequilíbrio termodinâmico entre ambos pode resultar em uma alteração importante no transporte de elétrons pela mesma. Assim, quando o gradiente de prótons é dissipado pela ação da ATP sintase, devido à adição de ADP, há um desequilíbrio que estimula a transferência de elétrons pela cadeia respiratória e, conseqüentemente, o consumo de oxigênio. Sendo assim, para que a ATP sintase esteja ativa, são necessários dois fatores: disponibilidade de ADP e potencial de membrana suficientemente alto (Nelson e Cox, 2000). Nesse contexto, o acoplamento da respiração mitocondrial é definido como a capacidade da mitocôndria gerar ATP quando exposta ao ADP, ou seja, unir (acoplar) os processos de oxidação e de fosforilação. A dissipação do gradiente eletroquímico de prótons no espaço mitocondrial intermembranas determinado por dano ou aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna desacopla o transporte de elétrons da síntese de ATP, resultando em um aumento do consumo de oxigênio (atividade respiratória aumentada) com reduzida formação de ATP (Nicholls e Ferguson, 2002).

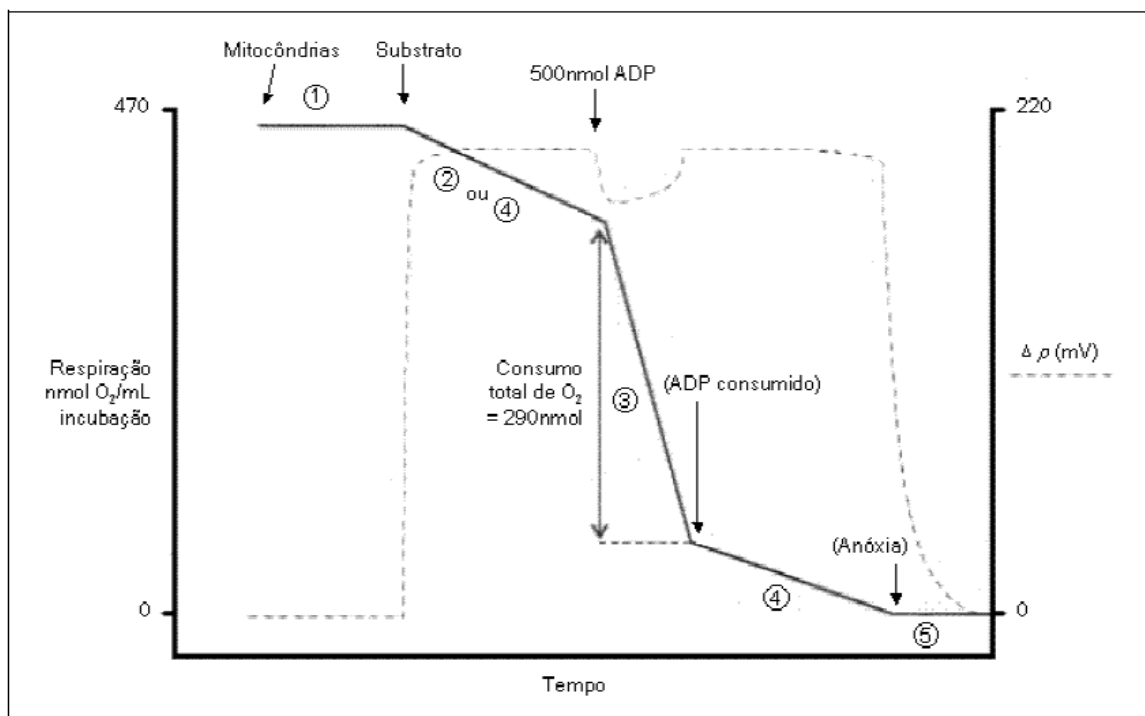


Figura 3. Estados da respiração mitocondrial. (Adaptado de Nicholls e Ferguson, 2002).

Além da regeneração do ATP, que é a sua principal função, a mitocôndria desempenha outros importantes papéis. Esta organela é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio e possui alta concentração de defesas antioxidantes nas células (Cadenas e Davies, 2000), gerando ânions superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) no espaço intermembrana pelo vazamento de elétrons que se combinam com o oxigênio molecular no complexo III em um processo que é dependente do potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ), e na matriz, através de um sítio não definido do complexo I (Han et al., 2001). Além disso, a mitocôndria participa ativamente da homeostase de cálcio (Nicholls e Akerman, 1982) e está envolvida em diversos processos que levam à morte celular, incluindo liberação de citocromo *c* (Liu et al., 1996). Acredita-se que todos estes processos estejam interligados e que um desequilíbrio nessas funções possa estar envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose lateral amiotrófica (Beal, 2007; Sasaki et al., 2007; Gil e Rego, 2008; Reddy e Beal, 2008), doenças psiquiátricas, tais como transtorno bipolar, esquizofrenia e depressão (Wang, 2007; Ben-Shacar e Kerry, 2008; Gardner et al., 2008; Shao et al., 2008; Regenold et al., 2009), bem como também de vários erros inatos do metabolismo (Schuck et al., 2002; Reis de Assis et al., 2004; Latini et al., 2005; Zugno et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Mirandola et al., 2008; Moshal et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; Viegas et al., 2008).

A função mitocondrial pode ser avaliada pela medida da produção de espécies reativas, do potencial de membrana mitocondrial, do estado redox estimado pelo conteúdo de NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> e pelo inchamento mitocondrial, que pode ser secundário à abertura do poro de transição mitocondrial.

Considerando que até o presente momento pouco se sabe sobre a fisiopatogenia da disfunção hepática apresentada pelos pacientes afetados pelas deficiências de LCHAD e MTP, o presente trabalho se propõe a investigar possíveis efeitos tóxicos dos ácidos graxos monocarboxílicos acumulados nessas doenças sobre parâmetros de metabolismo energético em fígado de ratos jovens.

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

Dentre as várias funções desempenhadas pela mitocôndria, uma das mais importantes é manter a homeostase celular de  $Ca^{2+}$ , que é responsável por coordenar um

vasto repertório de processos na célula (Rizzuto et al, 2012; Figueira et al., 2013). Essa organela tem a capacidade, quando íntegra e funcional, de captar o  $\text{Ca}^{2+}$  presente no citosol ou liberar seu estoque para a célula, mantendo a concentração intracelular desse cátion em condições ótimas para o funcionamento celular (Rizzuto et al, 2012; Figueira et al., 2013). Na matriz mitocondrial, o  $\text{Ca}^{2+}$  é capaz de formar precipitados inativos com o fosfato, o que faz com que a mitocôndria seja capaz de acumular grandes concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo chegar a 300  $\mu\text{M}$  dependendo do tecido (Starkov et al, 2010). O  $\text{Ca}^{2+}$  necessita de transportadores para ser captado e/ou liberado pela mitocôndria. Para acessar o espaço intermembrana ou ser liberado de volta no citosol, o  $\text{Ca}^{2+}$  utiliza os canais iônicos dependentes de voltagem (VDAC) localizados na membrana mitocondrial externa. Uma vez no espaço intermembrana, o  $\text{Ca}^{2+}$  é captado pela mitocôndria por um sistema uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (MCU) e liberado da matriz pelos trocadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (mNCX) e  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (mHCX) (Rizzuto et al, 2012; Bernardi e von Stockum, 2012) (Figura 4).

Em várias situações, a mitocôndria se torna a principal organela responsável por captar o excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, mantendo os níveis intracelulares desse cátion e o funcionamento celular (Rizzuto et al, 2012; Figueira et al., 2013). Por outro lado, uma elevada captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  além da sua capacidade pode levar a uma condição conhecida como transição de permeabilidade, resultado da abertura de um poro na membrana mitocondrial interna (Zoratti e Szabo, 1995; Adam-Vizi e Starkov, 2010; Starkov et al, 2010), a qual é um passo requerido na neurotoxicidade induzida por NMDA (Budd e Nicholls, 1996; Castilho et al, 1998, Stout et al, 1998). O poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial é formado por proteínas presentes na matriz mitocondrial ou na membrana mitocondrial interna e possui 2-3 nm de diâmetro (Starkov et al, 2010). As proteínas que formam o PTP ainda não são conhecidas, mas devem apresentar três características principais: capaz de se ligar a membrana interna, abrir um canal de 2-3 nm de diâmetro e ser completamente reversível (transitório) (Starkov et al, 2010). Por outro lado, evidências apontam que a ciclofilina D (Cyp D) é um componente chave para a ocorrência da transição de permeabilidade mitocondrial (Tanveer et al, 1996; Baines et al, 2005; Basso et al, 2005; Bernardi, 2013) (Figura 4). Além disso, o ADP é um potente inibidor da formação do PTP em organelas isoladas de cérebro (Rottenberg e Marbach, 1989; Rizzuto et al, 2012).

A permanente abertura do PTP resulta na 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 metabólitos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , GSH, NADH e NADPH), comprometimento da síntese de ATP e morte celular (apoptose e necrose) (Zoratti e Szabo, 1995; Crompton et al, 1999; Starkov et al, 2010; Rasola e Bernardi, 2011; Bernardi e von Stockum, 2012; Rizzuto et al, 2012; Figueira et al, 2013;).

Muitos trabalhos *in vitro* e *in vivo* tem relacionado disfunção mitocondrial à indução do PTP na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , demonstrando alteração nos parâmetros da homeostase bioenergética mitocondrial (Maciel et al, 2004; Mirandola et al, 2010; Amaral et al, 2012). Além disso, o ataque oxidativo por espécies reativas de oxigênio está descrito como um importante mecanismo potencializador da abertura do PTP (Kowaltowski et al, 2001; Adam-Vizi e Starkov, 2010). Neste contexto, altas concentrações de NADH previnem a abertura do PTP, por promover a redução do  $\text{NADP}^+$  catalisada pela transidrogenase mitocondrial e conseqüentemente melhoram a capacidade redox da mitocôndria (Lehninger et al, 1978; Hoek e Rydstrom, 1988; Zago et al, 2000).

O PTP é inibido por ciclosporina A (CsA), um conhecido peptídeo que se liga e inibe a proteína Cyp D (Starkov et al, 2010; Bernardi e von Stockum, 2012; Rizzuto et al, 2012), sendo que já foi demonstrado um efeito protetor dessa droga em modelos de isquemia (Nieminen et al, 1996; Schindler et al, 1996; Uchino et al, 1998; Petersen et al, 2000), sugerindo a importância do PTP na patogênese do dano isquêmico. No contexto de doenças neurodegenerativas, existe um crescente número de evidências indicando que um prejuízo na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  e a ocorrência do PTP contribuem para a disfunção neurológica numa variedade de doenças e que estão associados à neurodegeneração (Murphy et al, 1999; Friberg e Wieloch, 2002; Figueira et al, 2013).

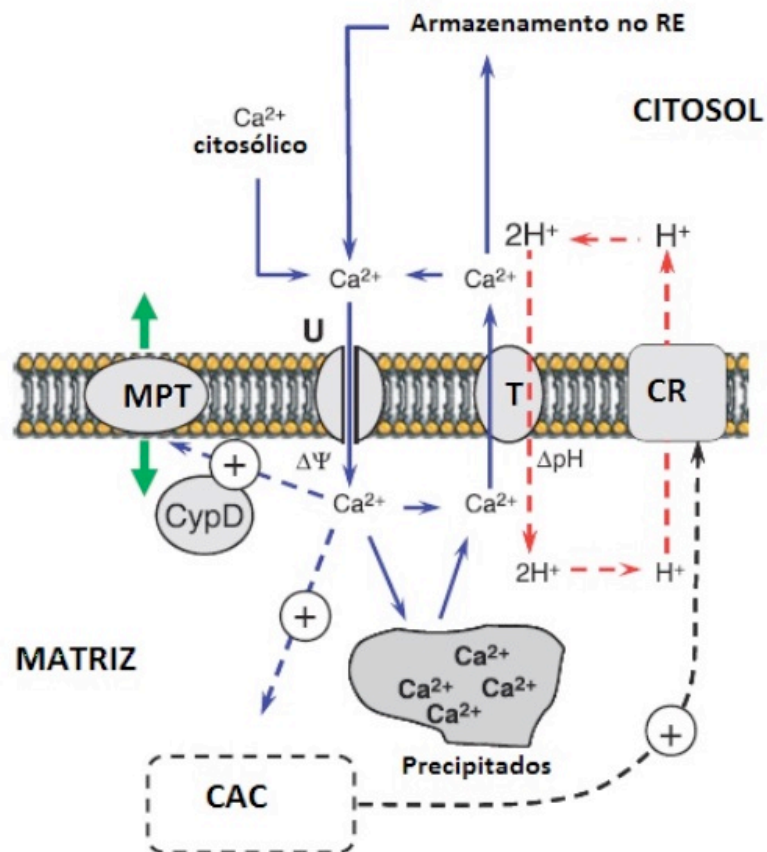


Figura 4. Homeostase mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ . As mitocôndrias acumulam  $\text{Ca}^{2+}$  exógeno por meio do transportador eletrogênico (uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , U) que facilita o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana mitocondrial interna para a matriz. O transporte é acoplado ao acúmulo simultâneo de fosfato inorgânico (não mostrado). Dentro da matriz, o  $\text{Ca}^{2+}$  e o fosfato acumulados são estocados na forma de precipitados inativos osmoticamente, e eventualmente liberados de volta no citosol através do trocador  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  (não mostrado) e/ou  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ , que também estão localizados na membrana mitocondrial interna. O processo de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  é direcionado pelo potencial de membrana mitocondrial; o processo de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  é direcionado pelo gradiente de pH, no caso do trocador  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ . Elevadas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial podem estimular as atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico (CAC), desse modo impulsionando a produção de energia na mitocôndria. Quando o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  ultrapassa um certo limiar, desencadeia-se a abertura do PTP, a qual também é modulada pela proteína localizada na matriz ciclofilina D (CypD). T: trocador; CR: cadeia respiratória (Adaptado de Starkov, 2010).



## **I.2. OBJETIVOS**

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

O objetivo geral deste trabalho foi o de investigar os efeitos *in vitro* dos ácidos graxos monocarboxílicos acumulados na deficiência de LCHAD sobre importantes parâmetros da homeostase energética em fígado de ratos jovens, visando a uma melhor compreensão dos mecanismos tóxicos desses ácidos graxos sobre o fígado.

### **I.2.2. Objetivos Específicos**

- Investigar o efeito *in vitro* dos ácidos 3-hidroxitetradecanóico (3HTA) e 3-hidroxi palmítico (3HPA) nas concentrações de 10-100  $\mu\text{M}$  sobre o potencial de membrana mitocondrial, sobre o inchamento mitocondrial, sobre a retenção de cálcio e sobre o conteúdo dos equivalentes reduzidos de NADH e NADPH em preparações mitocondriais de fígado de ratos de 30 dias;
- Investigar o efeito *in vitro* dos ácidos 3-hidroxitetradecanóico (3HTA) e 3-hidroxi palmítico (3HPA) nas concentrações de 10 a 100  $\mu\text{M}$  sobre os parâmetros respiratórios estados 3 e 4, razão de controle respiratório (RCR) e estado U, medidos através do consumo de oxigênio em preparações mitocondriais de fígado de ratos de 30 dias.
- Investigar o efeito *in vitro* do ácido dicarboxílico 3-hidroxitetradecanedióico (3HTDA) nas concentrações de 30 a 100  $\mu\text{M}$  sobre alguns desses parâmetros.

**PARTE II**  
*Artigo Científico*

Manuscript Number:

Title: Uncoupling, metabolic inhibition and induction of mitochondrial permeability transition in rat liver mitochondria caused by the major long-chain hydroxyl monocarboxylic fatty acids accumulating in LCHAD deficiency

Article Type: Regular Paper

Keywords: long-chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase deficiency; liver mitochondrial bioenergetics; mitochondrial permeability transition; calcium.

Corresponding Author: Dr. Moacir Wajner,

Corresponding Author's Institution: ICBS, UFRGS

First Author: Fernanda H Hickmann

Order of Authors: Fernanda H Hickmann; Cristiane Cecatto; Daniele Kleemann; Wagner O Monteiro; Roger F Castilho; Alexandre U Amaral; Moacir Wajner

Abstract: Patients with long-chain 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency commonly present liver dysfunction whose pathogenesis is unknown. We studied the effects of 3-hydroxylated fatty acids (LCHFAs) that accumulate in LCHAD deficiency on liver bioenergetics using mitochondrial preparations from young rats. We provide strong evidence that 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids, the monocarboxylic acids that are found at the highest tissue concentrations in this disorder, act as metabolic inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation. These conclusions are based on the findings that these fatty acids decreased ADP-stimulated (state 3) and uncoupled respiration, mitochondrial membrane potential and NAD(P)H content, and, in contrast, increased resting (state 4) respiration. We also verified that 3HTA and 3HPA markedly reduced Ca<sup>2+</sup> retention capacity and induced swelling in Ca<sup>2+</sup>-loaded mitochondria. These effects were mediated by mitochondrial permeability transition (MPT) induction since they were totally prevented by the classical MPT inhibitors cyclosporin A and ADP, as well as by ruthenium red, a Ca<sup>2+</sup> uptake blocker. Taken together, our data demonstrate that the major monocarboxylic LCHFA accumulating in LCHAD deficiency disrupt energy mitochondrial homeostasis in the liver. It is proposed that this pathomechanism may explain at least in part the hepatic alterations characteristic of the affected patients.

Suggested Reviewers: Abel Santamaria PhD

Professor, Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México D.F.

absada@yahoo.com

Cornelis Jakobs PhD

Professor, Metabolic Unit, Dept of Clinical Chemistry, University Medical Center, de Boelelaan 1118, Amsterdam

c.jakobs@vumc.nl

Antonia Ribes PhD

Professor, Institut Bioquímica Clínica, Corporació Sanitària Clinic and Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona  
aribes@clinic.ub.es

Paz Briones PhD  
Professor, Institut Bioquímica Clínica, Corporació Sanitària Clinic, Barcelona  
pbriones@clinic.ub.es

Departamento de Bioquímica  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Ramiro Barcelos, 2600 Anexo  
Porto Alegre – RS – Brasil  
90.035-003  
Fax +55 51 33085540  
E-mail: [mwajner@ufrgs.br](mailto:mwajner@ufrgs.br)

January 19<sup>th</sup>, 2015

Dra. Susanne Arnold,  
Executive editor,  
BBA- Bioenergetics

I am sending you our manuscript entitled “**Uncoupling, metabolic inhibition and induction of mitochondrial permeability transition in rat liver mitochondria caused by the major long-chain hydroxyl monocarboxylic fatty acids accumulating in LCHAD deficiency**”, which we would like to submit for publication in BBA – Bioenergetics.

This study was performed in strict accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Eighth edition, 2011) and approved by the Ethical Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. All efforts were also made to use the minimal number of animals necessary to produce reliable scientific data. The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

I also inform you that all authors have contributed significantly to the manuscript and agree with the submission of the paper at its present version. Moreover, the whole manuscript, or parts of it, will not be submitted elsewhere for

publication. Finally, there is no conflict of interest in the conduct and reporting of research.

This manuscript presents novel findings showing that long-chain monocarboxylic 3-hydroxy fatty acids that accumulate in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD), behave as uncouplers of oxidative phosphorylation, metabolic inhibitors and inductors of mitochondrial permeability transition, interfering therefore with mitochondrial energy production, redox balance and calcium homeostasis in liver. It is proposed that these pathomechanisms may contribute to the hepatic failure presented by LCHAD deficient patients.

I look forward to hearing from you in the near future.

Yours sincerely,

M. Wajner, MD, PhD

1           **Uncoupling, metabolic inhibition and induction of mitochondrial permeability**  
2           **transition in rat liver mitochondria caused by the major long-chain hydroxyl**  
3           **monocarboxylic fatty acids accumulating in LCHAD deficiency**

4

5

6   Fernanda Hermes Hickmann<sup>1</sup>, Cristiane Cecatto<sup>1</sup>, Daniele Kleemann<sup>1</sup>, Wagner Oliveira  
7   Monteiro<sup>1</sup>, Roger Frigério Castilho<sup>3</sup>, Alexandre Umpierrez Amaral<sup>1</sup>, Moacir Wajner<sup>1,2\*</sup>

8

9   <sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade  
10   Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

11   <sup>2</sup>Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS,  
12   Brazil

13   <sup>3</sup>Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade  
14   Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil.

15

16   **\*Corresponding author:** Moacir Wajner, Departamento de Bioquímica, Instituto de  
17   Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Rua Ramiro  
18   Barcelos, 2600 – Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS – Brazil. Phone: +55 51 3308-  
19   5571, fax: +55 51 3308-5540, e-mail: [mwajner@ufrgs.br](mailto:mwajner@ufrgs.br)

20

21 **Abstract**

22 Patients with long-chain 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency  
23 commonly present liver dysfunction whose pathogenesis is unknown. We studied the  
24 effects of 3-hydroxylated fatty acids (LCHFAs) that accumulate in LCHAD deficiency on  
25 liver bioenergetics using mitochondrial preparations from young rats. We provide strong  
26 evidence that 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids, the  
27 monocarboxylic acids that are found at the highest tissue concentrations in this disorder, act  
28 as metabolic inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation. These conclusions are  
29 based on the findings that these fatty acids decreased ADP-stimulated (state 3) and  
30 uncoupled respiration, mitochondrial membrane potential and NAD(P)H content, and, in  
31 contrast, increased resting (state 4) respiration. We also verified that 3HTA and 3HPA  
32 markedly reduced  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity and induced swelling in  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded  
33 mitochondria. These effects were mediated by mitochondrial permeability transition (MPT)  
34 induction since they were totally prevented by the classical MPT inhibitors cyclosporin A  
35 and ADP, as well as by ruthenium red, a  $\text{Ca}^{2+}$  uptake blocker. Taken together, our data  
36 demonstrate that the major monocarboxylic LCHFA accumulating in LCHAD deficiency  
37 disrupt energy mitochondrial homeostasis in the liver. It is proposed that this  
38 pathomechanism may explain at least in part the hepatic alterations characteristic of the  
39 affected patients.

40

41 **Keywords:** Long-chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase deficiency; liver  
42 mitochondrial bioenergetics; mitochondrial permeability transition; calcium.

43

44

45

46

47



48 **Abbreviations:** Alm, alamethicin; ANT, adenine nucleotide translocator; ATC,  
49 atractiloyde; BSA, bovine serum albumin; CCCP, carbonyl cyanide 3-chlorophenyl  
50 hydrazine; CsA, cyclosporin A; DTT, dithiothreitol; EGTA, ethylene glycol-bis (2-  
51 aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; EtOH, ethanol; FAU, fluorescence arbitrary  
52 units; GDP, guanosine diphosphate; HEPES, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane-  
53 sulfonic acid]; 3HTDA, 3-hydroxytetradecanodioic acid; 3HTA, 3-hydroxytetradecanoic  
54 acid; 3HPA, 3-hydroxypalmitic acid; LCHAD, long-chain 3-hydroxy-acyl-CoA  
55 dehydrogenase; LCHFA, long-chain 3-hydroxylated fatty acids;  $\Delta\Psi_m$ , mitochondrial  
56 membrane potential; MPT, mitochondrial permeability transition; NEM, *N*-ethylmaleimide;  
57 RCR, respiratory control ratio; RR, ruthenium red.

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71       **1. Introduction**

72           The mitochondrial enzyme long- chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase  
73 (LCHAD, EC 1.1.1.211) is responsible for the third step in the oxidation of long-chain fatty  
74 acids. Deficiency of LCHAD was described in 1989 [1] and is a relatively frequent fatty  
75 acid oxidation defect [2]. It is biochemically characterized by accumulation of long-chain  
76 3-hydroxylated fatty acids (LCHFA) in body fluids and tissues, as well as by episodes of  
77 lactic acidemia and hypoketotic hypoglycemia, particularly during periods of intense  
78 catabolism, such as prolonged fasting and infections [3-6]. The clinical manifestations of  
79 LCHAD deficiency are more severe than the  $\beta$ -oxidation disorders of medium and short  
80 chain fatty acids [7-8], suggesting a high toxicity for the accumulating LCHFA. Affected  
81 patients present a wide variety of symptoms, including severe hepatopathy and  
82 cardiomyopathy, as well as retinopathy, hypotonia, peripheral neuropathy, speech and  
83 developmental delay, lethargy and seizures [9-10].

84           Hepatic dysfunction is a common finding in LCHAD deficiency, especially during  
85 episodes of metabolic decompensation, which are characterized by hypoketosis  
86 hypoglycemia, hyperlactic acidemia and lethargy [11]. Most patients present hepatomegaly,  
87 acute cholestatic jaundice, massive hepatic necrosis and hepatic steatosis accompanied by  
88 fibrosis [12-14].

89           Treatment is based on dietary fat restriction, fasting avoidance, night feeds, as well  
90 as supplementation of essential fatty acids and medium chain triglycerides [15-18].

91           The pathophysiology of tissue damage in LCHAD deficiency is still unclear, but  
92 may possibly be associated with hypoglycemia and hypoketonemia leading to energy  
93 deprivation. Therefore, since liver essentially utilizes fatty acids for most of its energetic  
94 needs, the hepatic symptomatology of LCHAD deficiency may involve low energy

95 production from fatty acids and/or alternatively due to the toxicity of LCHFA or their long-  
96 chain 3-hydroxyacylcarnitines derivatives that accumulate in this disorder [19-22].  
97 Noteworthy, hyperlactic acidemia associated with abnormal mitochondrial morphology  
98 with swollen appearance and fat infiltration observed in these patients indicates a role for  
99 mitochondrial energy disruption in its ethiopathogenesis [23]. Recent experimental studies  
100 demonstrating that the monocarboxylic LCHFA accumulating in LCHAD deficiency  
101 provoke impairment of mitochondrial bioenergetics in forebrain and heart of young rats,  
102 strengthen this hypothesis [24-25]. In a further report, it was demonstrated that LCHFA  
103 induce mitochondrial permeability transition (MPT) in  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded brain mitochondria  
104 [26]. These data provide unequivocal evidence that LCHFA disturb energy mitochondrial  
105 homeostasis in brain and heart. However, to the best of our knowledge, there is no work  
106 evaluating mitochondrial function in liver exposed to the LCHFA accumulating in LCHAD  
107 deficiency.

108 Thus, in the present work we investigated the role of the 3-hydroxytetradecanodioic  
109 (3HTDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on  
110 important parameters of mitochondrial bioenergetics, namely the respiratory states 3 and 4,  
111 respiratory control ratio (RCR) and uncoupled respiration, as well as the mitochondrial  
112 membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), swelling,  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity and NAD(P)H content in  
113 liver mitochondrial preparations from young rats in the presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the  
114 hopes to clarify the mechanisms of toxicity of these compounds.

115

116

117

118 **2. Material and methods**

119

120 *2.1 Reagents*

121 All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), except  
122 for 3HTDA (96% purity), which was synthesized by Dr. Ernesto Brunet, from Universidad  
123 Autonoma de Madrid. Stock solutions of a racemic mixture (DL) of 3HTDA, 3HTA and  
124 3HPA were prepared in ethanol (EtOH) to dissolve the fatty acids and added to incubation  
125 medium at final concentrations of 10 – 100  $\mu$ M. The final concentration of EtOH in the  
126 incubation medium was 1%. The same percentage of EtOH was present in controls and  
127 proved not to alter *per se* the parameters evaluated.

128

129 *2.2 Animals*

130 Thirty-day-old Wistar rats obtained from our breeding colony were used. The  
131 animals were maintained on a 12:12 h light/dark cycle in air conditioned constant  
132 temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) colony room, with free access to water and 20% (w/w) protein  
133 commercial chow. This study was performed in strict accordance with the Guide for the  
134 Care and Use of Laboratory Animals (Eighth edition, 2011) and approved by the Ethical  
135 Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. All efforts  
136 were also made to use the minimal number of animals necessary to produce reliable  
137 scientific data. The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

138

139 *2.3 Preparation of mitochondrial fractions*

140 Mitochondrial preparations from liver were isolated according to Mirandola (2008)  
141 [27], with modifications. Animals were euthanized by decapitation, the liver was removed  
142 and homogenized with a glass hand-held homogenizer in ice-cold mitochondria isolation  
143 buffer containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.1 % bovine serum  
144 albumin (BSA, free fatty acid) and 10 mM HEPES, pH 7.2. The homogenate was  
145 centrifuged at 2,000 x g for 3 min at 4°C. The pellet was discarded and the supernatant was  
146 centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4°C. The resultant pellet was resuspended in 5 mL  
147 of isolation buffer without EGTA and centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4°C. The final  
148 pellet was resuspended in isolation buffer without EGTA in an approximate protein  
149 concentration of 30 mg . mL<sup>-1</sup>. Protein concentration was measured by the method of  
150 Bradford (1976) [28], using BSA as standard. Mitochondria obtained from liver were used  
151 in the assays immediately after isolation and assays were carried out in the absence or  
152 presence of Ca<sup>2+</sup>.

153

#### 154 *2.4 Respiratory parameters determined through mitochondrial oxygen consumption*

155 The rate of oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type  
156 electrode in a thermostatically controlled (37°C) and magnetically stirred incubation  
157 chamber. 3HTDA, 3HTA or 3HPA (10–100 μM) were added to the reaction medium at the  
158 beginning of the assay. The assay was performed with mitochondrial preparations (0.75 mg  
159 protein<sup>-1</sup>. mL<sup>-1</sup> when using 2.5 mM glutamate plus 2.5 mM malate and 0.5 mg protein<sup>-1</sup>.  
160 mL<sup>-1</sup> when 5 mM succinate plus 4 μM rotenone as substrates) and incubated for 60 sec in a  
161 buffer containing 0.1 M sucrose, 65 mM potassium chloride, 10 mM HEPES, 1 mM  
162 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 200 μM EGTA, pH 7.2. State 3 respiration was measured after addition of 1

163 mM ADP to the incubation medium and uncoupled respiration after addition of 3  $\mu\text{M}$   
164 CCCP. To measure resting (state 4) respiration, 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  oligomycin A was added to the  
165 incubation medium. In some experiments, guanosine diphosphate (GDP, 200  $\mu\text{M}$ ) and  
166 atractiloyde (ATC, 30  $\mu\text{M}$ ) were added to the mitochondrial preparations. The RCR (state  
167 3/state 4) was then calculated. States 3 and 4 were expressed as  $\text{nmol O}_2 \text{ consumed} \cdot \text{min}^{-1} \cdot$   
168  $\text{mg protein}^{-1}$ . Only mitochondrial preparations with RCR greater than 3 were used in the  
169 experiments.

170

### 171 *2.5 Experimental procedures for the spectrofluorimetric and spectrophotometric assays*

172 Measurements of  $\Delta\Psi\text{m}$ , NAD(P)H content and  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity were  
173 performed using spectrofluorimetry, whereas mitochondrial swelling was measured by  
174 spectrophotometry. Mitochondrial incubations were carried out at  $37^\circ\text{C}$ , with continuous  
175 magnetic stirring and the assays were conducted in the presence of 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  oligomycin  
176 A (resting respiration) using mitochondria ( $0.5 \text{ mg protein} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) supported by 2.5 mM  
177 glutamate plus 2.5 mM malate or 5 mM succinate plus 4  $\mu\text{M}$  rotenone. 3HTDA (30-100  
178  $\mu\text{M}$ ), 3HTA (10-100  $\mu\text{M}$ ), 3HPA (10-100  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CaCl}_2$  (20-40  $\mu\text{M}$ ), CCCP (3  $\mu\text{M}$ ) and  
179 alamethicin (Alm, 40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) were added as indicated by the arrows in the figures. In  
180 some experiments, ruthenium red (RR, 5  $\mu\text{M}$ ), cyclosporin A (CsA, 1  $\mu\text{M}$ ), ADP (300  $\mu\text{M}$ ),  
181 dithiothreitol (DTT, 5 mM) and *N*-ethylmaleimide (20  $\mu\text{M}$ , NEM) were added in the assay.  
182 Traces are representative of independent experiments carried out in mitochondrial  
183 preparations from liver of three animals and were expressed as arbitrary units, unless  
184 otherwise stated. Statistical analyses were also carried out by analyzing quantitatively the  
185 data obtained from the assays.

## 186 *2.6 Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )*

187           The  $\Delta\Psi_m$  was estimated according to Akerman and Wikstrom (1976) [29] and  
188   Figueira and collaborators (2012) [30] in medium containing 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
189   0.1 mg . mL<sup>-1</sup> BSA, 5 mM HEPES, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 or 100  $\mu$ M EGTA, pH 7.2. The  
190   fluorescence of 5  $\mu$ M cationic dye safranin O, a  $\Delta\Psi_m$  indicator, was followed at  
191   excitation and emission wavelengths of 495 and 586 nm. CCCP was added in the end of  
192   measurements to abolish  $\Delta\Psi_m$ .

193

## 194 *2.7 Mitochondrial NAD(P)H*

195           Mitochondrial matrix NAD(P)H autofluorescence was measured at 366 nm  
196   excitation and 450 nm emission wavelengths, in medium containing 150 mM KCl, 5 mM  
197   MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg . mL<sup>-1</sup> BSA, 5 mM HEPES, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 or 100  $\mu$ M EGTA, pH 7.2.  
198   CCCP was added in the end of the measurements to induce maximal NAD(P)H oxidation.

199

## 200 *2.8 Mitochondrial swelling*

201           Mitochondrial swelling was determined in 96-well plates as the decrease in the  
202   turbidity of the mitochondrial suspension measured at 540 nm wavelength using a  
203   SpectraMax M5 microplate reader, in a medium (final volume: 250  $\mu$ L) containing 125  
204   mM sucrose, 65 mM KCl, 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg . mL<sup>-1</sup> BSA, 10 mM  
205   HEPES, 15  $\mu$ M EGTA, pH 7.2. A decrease in the turbidity indicates an increase in  
206   mitochondrial swelling. Alamethicin (Alm) was added in the end of the experiment to  
207   provoke maximal swelling.

208 *2.9 Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> retention capacity*

209 Ca<sup>2+</sup> retention capacity was determined in medium containing 150 mM KCl, 5 mM  
210 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg · mL<sup>-1</sup> BSA, 5 mM HEPES, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 μM EGTA, pH 7.2,  
211 following the external free Ca<sup>2+</sup> levels using 0.2 μM Calcium Green-5N (Molecular Probes,  
212 Invitrogen, Carlsbad, CA) at excitation and emission wavelengths of 506 and 532 nm,  
213 respectively [31]. In the end of the measurements, maximal Ca<sup>2+</sup> release was induced by  
214 CCCP.

215

216 *2.10 Statistical analysis*

217 Results are presented as mean ± standard deviation, unless otherwise stated. Assays  
218 were performed in triplicate and the mean was used for statistical analysis. Data were  
219 analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the *post-hoc* Duncan's  
220 multiple comparison test when F was significant. Differences between groups were rated  
221 significant at P < 0.05. All analyses were carried out using the 19.0 SPSS Statistics  
222 software.

223

224 **3. Results**

225

226 *3.1 Long-chain monocarboxylic 3-hydroxylated fatty acids alter oxygen consumption in*  
227 *liver mitochondria*

228 It was first investigated the effect of the 3HTDA, 3HTA and 3HPA on liver  
229 mitochondrial respiratory parameters measured by oxygen consumption using glutamate  
230 plus malate or succinate as respiratory substrates. 3HTA and 3HPA (50 and 100 μM)

35



231 markedly increased resting (state 4) (Figure 1B: [ $F_{(7,19)}=12.92$ ,  $P<0.001$ ]) and decreased  
232 ADP-stimulated (state 3) (Figure 1A: [ $F_{(7,19)}=3.447$ ,  $P<0.05$ ]), uncoupled respiration  
233 (Figure 1D: [ $F_{(7,18)}=5.538$ ,  $P<0.01$ ]) and RCR (Figure 1C: [ $F_{(7,19)}=23.13$ ,  $P<0.001$ ]) in a  
234 dose dependent manner with glutamate plus malate as substrates. Similar results were  
235 obtained with succinate-supported mitochondria (Figures 2A: [ $F_{(6,14)}=3.054$ ,  $P<0.05$ ]; 2B:  
236 [ $F_{(6,14)}=16.82$ ,  $P<0.001$ ]; 2C: [ $F_{(6,14)}=24.73$ ,  $P<0.001$ ]; 2D: [ $F_{(6,14)}=8.095$ ,  $P<0.01$ ]). We also  
237 verified that the 3HTA-induced increase of resting respiration was attenuated by the  
238 competitive adenine nucleotide translocator (ANT) inhibitor ATC (Figure 1E:  
239 [ $F_{(3,20)}=53.56$ ,  $P<0.001$ ]), but not by the UCP inhibitor GDP (Figure 1F: [ $F_{(3,8)}=53.19$ ,  
240  $P<0.001$ ]), suggesting a role for ANT in the increase of state 4 respiration provoked by  
241 3HTA. In contrast, apart from a moderate reduction of RCR, overall 3HTDA was not able  
242 to significantly alter these respiratory parameters (Figure 1).

243

### 244 *3.2 Long-chain monocarboxylic 3-hydroxylated fatty acids reduce $\Delta\Psi_m$ in liver* 245 *mitochondria*

246 Next, we assessed the influence of 3HTDA, 3HTA and 3HPA on  $\Delta\Psi_m$  in liver  
247 mitochondria supported by glutamate plus malate or succinate in order to further investigate  
248 the uncoupling action of 3HTA and 3HPA. We verified that 3HTA and 3HPA (100  $\mu\text{M}$ ),  
249 but not 3HTDA (100  $\mu\text{M}$ ), strongly dissipated  $\Delta\Psi_m$  (Figure 3E).

250 It was also observed that low concentrations of 3HTA and 3HPA (10-30  $\mu\text{M}$ )  
251 provoked a strongly dissipation of  $\Delta\Psi_m$  when mitochondria were challenged by  $\text{Ca}^{2+}$  in a  
252 medium with low EGTA concentration (Figures 3A: [ $F_{(3,8)}=189.1$ ,  $P<0.001$ ]; 3B:  
253 [ $F_{(3,8)}=60.78$ ,  $P<0.001$ ]). Furthermore, RR, an inhibitor of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake,

254 abolished the reduction of  $\Delta\Psi_m$  caused by 3HTA, emphasizing the importance of  $Ca^{2+}$  in  
255 this effect. It can be also observed that the classical inhibitors of MPT, CsA and ADP also  
256 protected glutamate plus malate (Figure 3C: [ $F_{(5,12)}=57.81$ ,  $P<0.001$ ]) or succinate-  
257 supported (Figure 3D: [ $F_{(3,8)}=767.6$ ,  $P<0.001$ ]) mitochondria against membrane  
258 depolarization. In contrast, it can be seen in the figure that dithiothreitol (DTT) and *N*-  
259 ethylmaleimide (NEM) were not able to prevent the 3HTA-induced  $\Delta\Psi_m$  reduction using  
260 glutamate plus malate as substrates, making unlikely an oxidative attack on thiol groups of  
261 the MPT pore. Finally, we found that the dicarboxylic 3HTDA did not alter  $\Delta\Psi_m$  in the  
262 presence or absence of  $Ca^{2+}$  (Figures 3A and 3E).

263

### 264 *3.3 Long-chain monocarboxylic 3-hydroxylated fatty acids decrease NAD(P)H matrix* 265 *mitochondrial content in liver*

266 In the next set of experiments we evaluated the effect of 3HTDA, 3HTA and 3HPA  
267 on mitochondrial NAD(P)H content in liver mitochondria supported by glutamate plus  
268 malate or succinate. We observed that 3HTA and 3HPA (100  $\mu$ M), but not 3HTDA (100  
269  $\mu$ M), provoked a significant decrease of NAD(P)H levels (Figure 4D).

270 In addition, 3HTA and 3HPA (30  $\mu$ M) provoked a decrease of NAD(P)H content  
271 when  $Ca^{2+}$  was added to the medium that contained a low concentration of EGTA (Figure  
272 4A: [ $F_{(3,8)}=687.5$ ,  $P<0.001$ ]), suggesting that the reduced equivalents were oxidized or lost  
273 from the matrix. Since the decrease in mitochondrial NAD(P)H content was prevented by  
274 CsA, ADP and RR, it is conceivable that this effect may be attributed to MPT pore opening  
275 (Figures 4B: [ $F_{(3,8)}=156.7$ ,  $P<0.001$ ]; 4C: [ $F_{(3,8)}=137.7$ ,  $P<0.001$ ]). Furthermore, 3HTDA,

276 the dicarboxylic analogue of 3HTA, did not change NAD(P)H content both in the presence  
277 or absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Figures 4A and 4D).

278

#### 279 *3.4 Long-chain monocarboxylic 3-hydroxylated fatty acids induce swelling in liver* 280 *mitochondria*

281         Considering that induction of MPT is classically accompanied by mitochondrial  
282 swelling, we investigated the influence of 3HTDA, 3HTA and 3HPA on mitochondrial  
283 swelling in  $\text{Ca}^{2+}$ -loaded mitochondria. It was found that 30  $\mu\text{M}$  of 3HTA and 3HPA  
284 significantly induced swelling in liver mitochondria supported by glutamate plus malate in  
285 the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Figures 5A: [ $F_{(3,8)}=1072.0$ ,  $P<0.001$ ]; 5B: [ $F_{(3,8)}=40.39$ ,  $P<0.001$ ]).  
286 Furthermore, this effect was fully prevented by RR, CsA and ADP (Figure 5B), indicating  
287 MPT induction by these LCHFA. In contrast, 3HTDA did not alter this parameter (Figure  
288 5A).

289

#### 290 *3.5 Long-chain monocarboxylic 3-hydroxylated fatty acids reduce $\text{Ca}^{2+}$ retention capacity* 291 *in liver mitochondria*

292         Since MPT induction may compromise mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and lead to  
293 release of this cation from the mitochondria, we determined the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$   
294 retention capacity in the presence of 3HTDA, 3HTA or 3HPA using glutamate plus malate  
295 or succinate as substrates. It can be seen in Figure 6A-D that 3HTA and 3HPA (10-30  $\mu\text{M}$ )  
296 significantly reduced the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity, an effect that was  
297 completely avoided by CsA. In contrast, 3HTDA did not alter mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  retention  
298 capacity.

299 **4. Discussion**

300 We demonstrated here that the major monocarboxylic LCHFA accumulating in  
301 LCHAD deficiency (3HTA and 3HPA) disrupt mitochondrial functions in liver of young  
302 rats at concentrations as low as 10  $\mu$ M, in contrast to the dicarboxylate fourteen carbon  
303 chain analogue 3HTDA, which caused no effect on all evaluated parameters. 3HPA and  
304 3HTA impaired liver mitochondrial bioenergetics by behaving as uncouplers, metabolic  
305 inhibitors and MPT inductors. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity was also compromised  
306 by these fatty acids, impairing therefore cellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis.

307 We first observed a decrease in state 3 and uncoupled mitochondrial respiration  
308 caused by 3HTA and 3HPA indicating that these fatty acids may act as metabolic  
309 inhibitors. These fatty acids also increased state 4 respiration and decreased RCR,  $\Delta\Psi_m$   
310 and mitochondrial NAD(P)H content, implying that they also behave as uncouplers of  
311 oxidative phosphorylation. These observations may possibly be related to the lactic  
312 acidemia and mitochondrial morphological abnormalities observed in tissues from patients  
313 affected by LCHAD deficiency [13, 32]. We also found that the ANT inhibitor ATC  
314 attenuated 3HTA-induced increase of resting respiration (state 4), suggesting that ANT was  
315 involved in this effect. In contrast, the UCP inhibitor GDP did not change this effect, ruling  
316 out a role for UCP in the increase of resting respiration in the liver. However, it is  
317 important to stress that UCP expression is low in the liver tissue [33].

318 Uncoupling of oxidative phosphorylation had been previously demonstrated for  
319 non-hydroxylated long-chain fatty acids. The protonophoric mechanism of this effect is  
320 thought to be due to their transbilayer movement towards the mitochondrial matrix when  
321 undissociated (linked to protons) and their transfer as anions in the opposite direction

322 through the inner membrane. The passage of dissociated fatty acids is usually facilitated by  
323 the ANT and UCP [34-35]. In this context, some groups have provided evidence that ATC  
324 abolishes the uncoupling effect induced by palmitic acid in skeletal muscle mitochondria  
325 [36] whereas GDP compromises the transport of fatty acids and fatty acid peroxides  
326 through UCP [37-38]. However, we cannot discard that other mitochondrial carriers, such  
327 as the glutamate/aspartate antiporter [36, 39] may also be a target for the long-chain fatty  
328 acids. Our present results indicate that the monocarboxylic LCHFA accumulating in  
329 LCHAD deficiency may act as uncouplers of oxidative phosphorylation through the  
330 involvement of ANT but not of UCP as shown previously for the non-branched long-chain  
331 fatty acids [37].

332 We also demonstrated here that low concentrations of 3HTA and 3HPA (10-30  
333  $\mu\text{M}$ ), but not 3HTDA, strongly dissipated  $\Delta\Psi\text{m}$  in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Furthermore, RR, a  
334 known inhibitor of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter [40], and CsA plus ADP, classical  
335 inhibitors of MPT, prevented  $\Delta\Psi\text{m}$  dissipation, supporting a role for  $\text{Ca}^{2+}$  and MPT  
336 induction in these effects. CsA is an inhibitor of MPT by inactivating the cyclophilin D, a  
337 mitochondrial matrix protein associated with the MPT occurrence [41-44], whereas ADP is  
338 a potent inhibitor of MPT in isolated mitochondria by binding to ANT in the matrix side  
339 [31, 45]. We also found that neither the potent reducing agent DTT nor the thiol group  
340 protector NEM avoided the  $\Delta\Psi\text{m}$  loss, implying that an oxidative attack to MPT pore was  
341 probably not involved in 3HTA-induced MPT. In this regard, a common explanation for the  
342 induction of nonselective permeabilization was the oxidation of membrane protein thiol  
343 groups on the MPT pore [46-47], but this was not the case for these compounds, not  
344 supporting therefore a role for oxidative damage in this effect.

345 3HTA and 3HPA, at low concentrations (30  $\mu$ M), also decreased mitochondrial  
346 matrix NAD(P)H content after  $\text{Ca}^{2+}$  loading, which was totally abolished by CsA plus ADP  
347 and by RR, implying that the decrease of matrix reduced equivalents may have occurred as  
348 a consequence of nonselective inner membrane permeabilization due to MPT.  
349 Alternatively, NADH consumption due to MPT induction and consequent activation of the  
350 electron transport flow may have also contributed to the reduction of NAD(P)H  
351 concentrations as here observed [46, 48-49]

352 The nonselective permeabilization caused by MPT activation is usually  
353 accompanied by swelling and loss of mitochondrial elements ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , glutathione,  
354 NADH and NADPH), including pro-apoptotic factors such as cytochrome c, potentially  
355 leading to apoptosis or/and necrosis, as well as impairment of oxidative phosphorylation  
356 and ATP synthesis [50-56]. In this regard, we demonstrated that 3HTA and 3HPA  
357 provoked extensive mitochondrial swelling after  $\text{Ca}^{2+}$  addition and this was totally reverted  
358 by CsA and ADP, as well as by RR, confirming the occurrence of MPT.

359 Another important contribution of our work was that the major fatty acids  
360 accumulated in LCHAD deficiency also strongly compromised the capacity of  
361 mitochondria to uptake and retain  $\text{Ca}^{2+}$ , which is an important function of this organelle  
362 [57-61]. Again, this effect was totally prevented by CsA, indicating that the reduction in  
363 mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity was a consequence of MPT induction. Indeed, MPT  
364 pore opening could allow  $\text{Ca}^{2+}$  release from the matrix after reaching a threshold,  
365 overcoming mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity [50, 53, 55].

366 It is important to emphasize that the effects found in our work were selective for the  
367 monocarboxylic LCHFAs, since the dicarboxylic 3HTDA did not alter any of the tested  
368 parameters. Noteworthy, previous unpublished findings from our lab showed that the

369 dicarboxylic acids adipic, suberic and sebacic acids do not alter important parameters of  
370 mitochondrial bioenergetics. A possible explanation for the lack of effect of the  
371 dicarboxylates could be because they cannot enter into mitochondrial matrix through the  
372 inner mitochondrial membrane by diffusion, as possibly occurs with the monocarboxylic  
373 analogues. However, more work is necessary to establish the exact causes by which  
374 3HTDA did not change the respiratory parameters and other parameters of bioenergetics.

375 Our present work show that the significant findings here reported in liver  
376 mitochondria were more pronounced and already achieved with lower doses of the  
377 LCHFAs, as compared to those found in recent publications from our group using  
378 mitochondria isolated from brain [24, 26], indicating that liver is more vulnerable to the  
379 deleterious effects of these fatty acids. It is therefore tempting to speculate that the higher  
380 vulnerability of the liver to the effects of 3HTA and 3HPA on mitochondrial functions may  
381 be possibly associated with the severe liver symptomatology, as compared to the  
382 neurological manifestations, in patients with LCHAD deficiency [11, 14]. On the other  
383 hand, considering that fatty acid synthesis and metabolism is very active in the liver, and  
384 besides that this tissue uses essentially fatty acids for energy supply, it is conceivable that  
385 the concentrations of these monocarboxylic hydroxylated fatty acids in patients affected by  
386 LCHAD deficiency are much higher in the liver, relatively to other tissues including the  
387 brain.

388 Regarding to the precise mechanisms of MPT induction caused by LCHFAs, it is  
389 possible that this have occurred due to the oxidative phosphorylation uncoupling effects of  
390 3HTA and 3HPA, which were previously shown to provoke MPT pore opening [62-65].  
391 Alternatively, based on our findings showing that 3HTA-induced state 4 increase was  
392 attenuated by ATC, nonselective permeabilization induced by the monocarboxylic LCHFAs

393 may be a result of an interaction of these fatty acids with the cytosolic side of ANT, as  
394 previously demonstrated for ATC and other similar compounds [66-68].

395 Therefore, although it is presumed that our present data may be of  
396 pathophysiological importance to explain hepatic injury in LCHAD deficiency, the liver  
397 concentrations of LCHFA in patients affected by LCHAD are still unknown. We showed  
398 here that the LCHFA that most accumulate in these disorders, particularly 3HPA and  
399 3HTA, reduced the  $\Delta\Psi_m$  and provoked swelling in the presence of calcium that were  
400 prevented by CsA, ADP and RR at similar or even lower concentrations (10  $\mu$ M) than those  
401 found in plasma of the affected patients, especially during crises of metabolic  
402 decompensation that are accompanied by a worsening of hepatic clinical manifestations [3,  
403 69]. It is emphasized that these crises generally follow infections and accelerated  
404 catabolism that lead to increased tissue levels of these fatty acids [69].

405

## 406 **5. Conclusions**

407 In conclusion, to the best of our knowledge we provide for the first time  
408 experimental evidence that the monocarboxylic LCHFA that most accumulate in LCHAD  
409 deficiency behave as strong metabolic inhibitors, uncoupling agents and MPT inductors in  
410 liver from young rats. Since these effects might potentially reduce energy production, we  
411 propose that disruption of mitochondrial homeostasis may be associated with the hepatic  
412 failure presented by patients affected by LCHAD deficiency.

413

414



## 415 **Acknowledgements**

416 This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento  
417 Científico e Tecnológico (CNPq, # 470236/2012-4), Fundação de Amparo à Pesquisa do  
418 Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, # 10/0031-1), Fundação de Amparo à Pesquisa  
419 do Estado de São Paulo (FAPESP, # 2011/50400-0), Pró-Reitoria de Pesquisa/Universidade  
420 Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS, # PIBITI 18489), Rede Instituto  
421 Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) (# 01.06.0842-00) and Instituto Nacional de Ciência  
422 e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN, # 573677/2008-5).

423

## 424 **References**

- 425 [1] R.J. Wanders, M. Duran, L. Ijlst, J.P. de Jager, A.H. van Gennip, C. Jakobs, L. Dorland, F.J. van  
426 Sprang, Sudden infant death and long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, *Lancet*, 2 (1989)  
427 52-53.
- 428 [2] C.R. Scriver, Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., *The metabolic and molecular bases of inherited*  
429 *disease*, 8 ed., McGraw-Hill Inc, New York, 2001.
- 430 [3] C.G. Costa, L. Dorland, I.T. de Almeida, C. Jakobs, M. Duran, B.T. Poll-The, The effect of fasting,  
431 long-chain triglyceride load and carnitine load on plasma long-chain acylcarnitine levels in  
432 mitochondrial very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, *J Inherit Metab Dis*, 21 (1998)  
433 391-399.
- 434 [4] S.R. Hintz, D. Matern, A. Strauss, M.J. Bennett, H.E. Hoyme, S. Schelley, J. Kobori, C. Colby, N.L.  
435 Lehman, G.M. Enns, Early neonatal diagnosis of long-chain 3-hydroxyacyl coenzyme a  
436 dehydrogenase and mitochondrial trifunctional protein deficiencies, *Mol Genet Metab*, 75 (2002)  
437 120-127.
- 438 [5] S.E. Olpin, S. Clark, B.S. Andresen, C. Bischoff, R.K. Olsen, N. Gregersen, A. Chakrapani, M.  
439 Downing, N.J. Manning, M. Sharrard, J.R. Bonham, F. Muntoni, D.N. Turnbull, M. Pourfarzam,  
440 Biochemical, clinical and molecular findings in LCHAD and general mitochondrial trifunctional  
441 protein deficiency, *J Inherit Metab Dis*, 28 (2005) 533-544.
- 442 [6] J. Sander, S. Sander, U. Steuerwald, N. Janzen, M. Peter, R.J. Wanders, I. Marquardt, G.C.  
443 Korenke, A.M. Das, Neonatal screening for defects of the mitochondrial trifunctional protein, *Mol*  
444 *Genet Metab*, 85 (2005) 108-114.
- 445 [7] E. Riudor, Neonatal onset in fatty acid oxidation disorders: how can we minimize morbidity and  
446 mortality?, *J Inherit Metab Dis*, 21 (1998) 619-623.
- 447 [8] F.V. Ventura, J.P. Ruiten, I.J. L, I.T. de Almeida, R.J. Wanders, Lactic acidosis in long-chain fatty  
448 acid beta-oxidation disorders, *J Inherit Metab Dis*, 21 (1998) 645-654.

449 [9] B. Wilcken, Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis, *J Inherit Metab*  
450 *Dis*, 33 (2010) 501-506.

451 [10] S.E. Waisbren, Y. Landau, J. Wilson, J. Vockley, Neuropsychological outcomes in fatty acid  
452 oxidation disorders: 85 cases detected by newborn screening, *Dev Disabil Res Rev*, 17 (2013) 260-  
453 268.

454 [11] D. Moczulski, I. Majak, D. Mamczur, An overview of beta-oxidation disorders, *Postepy Hig*  
455 *Med Dosw (Online)*, 63 (2009) 266-277.

456 [12] F. Rocchiccioli, R.J. Wanders, P. Aubourg, C. Vianey-Liaud, L. Ijlst, M. Fabre, N. Cartier, P.F.  
457 Bougneres, Deficiency of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: a cause of lethal  
458 myopathy and cardiomyopathy in early childhood, *Pediatr Res*, 28 (1990) 657-662.

459 [13] R.H. Amirkhan, C.F. Timmons, K.O. Brown, M.J. Weinberger, M.J. Bennett, Clinical,  
460 biochemical, and morphologic investigations of a case of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA  
461 dehydrogenase deficiency, *Arch Pathol Lab Med*, 121 (1997) 730-734.

462 [14] T. Tyni, J. Rapola, A. Paetau, A. Palotie, H. Pihko, Pathology of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA  
463 dehydrogenase deficiency caused by the G1528C mutation, *Pediatr Pathol Lab Med*, 17 (1997)  
464 427-447.

465 [15] M. Gillingham, S. Van Calcar, D. Ney, J. Wolff, C. Harding, Dietary management of long-chain  
466 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency (LCHADD). A case report and survey, *J Inherit Metab*  
467 *Dis*, 22 (1999) 123-131.

468 [16] J.M. Saudubray, D. Martin, P. de Lonlay, G. Touati, F. Poggi-Travert, D. Bonnet, P. Jouvret, M.  
469 Boutron, A. Slama, C. Vianey-Saban, J.P. Bonnefont, D. Rabier, P. Kamoun, M. Brivet, Recognition  
470 and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients, *J Inherit Metab Dis*, 22  
471 (1999) 488-502.

472 [17] U. Spiekerkoetter, P.A. Wood, Mitochondrial fatty acid oxidation disorders:  
473 pathophysiological studies in mouse models, *J Inherit Metab Dis*, 33 (2010) 539-546.

474 [18] C.B. Haglund, M.H. Stenlid, S. Ask, J. Alm, A. Nemeth, U. Dobel, A. Nordenstrom, Growth in  
475 Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency, *JIMD Rep*, 8 (2013) 81-90.

476 [19] U. Spiekerkoetter, M.J. Bennett, B. Ben-Zeev, A.W. Strauss, I. Tein, Peripheral neuropathy,  
477 episodic myoglobinuria, and respiratory failure in deficiency of the mitochondrial trifunctional  
478 protein, *Muscle Nerve*, 29 (2004) 66-72.

479 [20] U. Spiekerkoetter, Z. Khuchua, Z. Yue, M.J. Bennett, A.W. Strauss, General mitochondrial  
480 trifunctional protein (TFP) deficiency as a result of either alpha- or beta-subunit mutations exhibits  
481 similar phenotypes because mutations in either subunit alter TFP complex expression and subunit  
482 turnover, *Pediatr Res*, 55 (2004) 190-196.

483 [21] A. Sperk, M. Mueller, U. Spiekerkoetter, Outcome in six patients with mitochondrial  
484 trifunctional protein disorders identified by newborn screening, *Mol Genet Metab*, 101 (2010)  
485 205-207.

486 [22] R.K. Olsen, N. Cornelius, N. Gregersen, Genetic and cellular modifiers of oxidative stress: what  
487 can we learn from fatty acid oxidation defects?, *Mol Genet Metab*, 110 Suppl (2013) S31-39.

488 [23] T. Tyni, A. Majander, H. Kalimo, J. Rapola, H. Pihko, Pathology of skeletal muscle and impaired  
489 respiratory chain function in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency with the  
490 G1528C mutation, *Neuromuscul Disord*, 6 (1996) 327-337.

491 [24] A.M. Tonin, G.C. Ferreira, M. Grings, C.M. Viegas, E.N. Busanello, A.U. Amaral, A. Zanatta, P.F.  
492 Schuck, M. Wajner, Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites  
493 accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain, *Life Sci*, 86 (2010) 825-831.

494 [25] A.M. Tonin, A.U. Amaral, E.N. Busanello, M. Grings, R.F. Castilho, M. Wajner, Long-chain 3-  
495 hydroxy fatty acids accumulating in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and

496 mitochondrial trifunctional protein deficiencies uncouple oxidative phosphorylation in heart  
497 mitochondria, *J Bioenerg Biomembr*, 45 (2013) 47-57.

498 [26] A.M. Tonin, A.U. Amaral, E.N. Busanello, J. Gasparotto, D.P. Gelain, N. Gregersen, M. Wajner,  
499 Mitochondrial bioenergetics deregulation caused by long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating  
500 in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain: a possible role of mPTP opening as a pathomechanism  
501 in these disorders?, *Biochim Biophys Acta*, 1842 (2014) 1658-1667.

502 [27] S.R. Miranda, D.R. Melo, P.F. Schuck, G.C. Ferreira, M. Wajner, R.F. Castilho,  
503 Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with  
504 mitochondrial succinate uptake, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31 (2008) 44-54.

505 [28] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of  
506 protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72 (1976) 248-254.

507 [29] K.E. Akerman, M.K. Wikstrom, Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential,  
508 *FEBS Letters*, 68 (1976) 191-197.

509 [30] T.R. Figueira, D.R. Melo, A.E. Vercesi, R.F. Castilho, Safranin as a fluorescent probe for the  
510 evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells,  
511 *Methods Mol Biol*, 810 (2012) 103-117.

512 [31] A. Saito, R.F. Castilho, Inhibitory effects of adenine nucleotides on brain mitochondrial  
513 permeability transition, *Neurochem Res*, 35 (2010) 1667-1674.

514 [32] T. Tyni, H. Pihko, Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency, *Acta Paediatr*, 88  
515 (1999) 237-245.

516 [33] J. Nedergaard, D. Ricquier, L.P. Kozak, Uncoupling proteins: current status and therapeutic  
517 prospects, *EMBO Rep*, 6 (2005) 917-921.

518 [34] P. Schonfeld, L. Schild, W. Kunz, Long-chain fatty acids act as protonophoric uncouplers of  
519 oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria, *Biochim Biophys Acta*, 977 (1989) 266-272.

520 [35] P. Schonfeld, Anion permeation limits the uncoupling activity of fatty acids in mitochondria,  
521 *FEBS Lett*, 303 (1992) 190-192.

522 [36] E.N. Mokhova, L.S. Khailova, Involvement of mitochondrial inner membrane anion carriers in  
523 the uncoupling effect of fatty acids, *Biochemistry (Mosc)*, 70 (2005) 159-163.

524 [37] F. Goglia, V.P. Skulachev, A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of  
525 mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane  
526 leaflet, *FASEB J*, 17 (2003) 1585-1591.

527 [38] C. Affourtit, P.G. Crichton, N. Parker, M.D. Brand, Novel uncoupling proteins, *Novartis Found  
528 Symp*, 287 (2007) 70-80; discussion 80-91.

529 [39] V.P. Skulachev, Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics, *Biochim  
530 Biophys Acta*, 1363 (1998) 100-124.

531 [40] C.L. Moore, Specific inhibition of mitochondrial Ca<sup>++</sup> transport by ruthenium red, *Biochem  
532 Biophys Res Commun*, 42 (1971) 298-305.

533 [41] A. Tanveer, S. Virji, L. Andreeva, N.F. Totty, J.J. Hsuan, J.M. Ward, M. Crompton, Involvement  
534 of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca<sup>2+</sup> and oxidant stress, *Eur J  
535 Biochem*, 238 (1996) 166-172.

536 [42] C.P. Baines, R.A. Kaiser, N.H. Purcell, N.S. Blair, H. Osinska, M.A. Hambleton, E.W. Brunskill,  
537 M.R. Sayen, R.A. Gottlieb, G.W. Dorn, J. Robbins, J.D. Molkenin, Loss of cyclophilin D reveals a  
538 critical role for mitochondrial permeability transition in cell death, *Nature*, 434 (2005) 658-662.

539 [43] E. Basso, L. Fante, J. Fowlkes, V. Petronilli, M.A. Forte, P. Bernardi, Properties of the  
540 permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D, *J Biol Chem*, 280 (2005)  
541 18558-18561.

542 [44] P. Bernardi, The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved?, *Front Physiol*,  
543 4 (2013) 95.

544 [45] H. Rottenberg, M. Marbach, Adenine nucleotides regulate Ca<sup>2+</sup> transport in brain  
545 mitochondria, *FEBS Lett*, 247 (1989) 483-486.

546 [46] A.J. Kowaltowski, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, Mitochondrial permeability transition and  
547 oxidative stress., *FEBS Lett*, 495 (2001) 12-15.

548 [47] A.J. Kowaltowski, A.E. Vercesi, R.F. Castilho, Mitochondrial membrane protein thiol reactivity  
549 with N-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca<sup>2+</sup>: correlation with mitochondrial  
550 permeability transition, *Biochim Biophys Acta*, 1318 (1997) 395-402.

551 [48] D. Le-Quoc, K. Le-Quoc, Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation,  
552 and inner membrane permeability in rat liver mitochondria, *Arch Biochem Biophys*, 273 (1989)  
553 466-478.

554 [49] J.P. Kehrer, L.G. Lund, Cellular reducing equivalents and oxidative stress, *Free Radic Biol Med*,  
555 17 (1994) 65-75.

556 [50] M. Zoratti, I. Szabo, The mitochondrial permeability transition, *Biochim Biophys Acta*, 1241  
557 (1995) 139-176.

558 [51] A.A. Starkov, The molecular identity of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> sequestration system, *FEBS J*,  
559 277 (2010) 3652-3663.

560 [52] A. Rasola, P. Bernardi, Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis  
561 and necrosis, *Cell Calcium*, 50 (2011) 222-233.

562 [53] P. Bernardi, S. von Stockum, The permeability transition pore as a Ca(2+) release channel: new  
563 answers to an old question, *Cell Calcium*, 52 (2012) 22-27.

564 [54] R. Rizzuto, D. De Stefani, A. Raffaello, C. Mammucari, Mitochondria as sensors and regulators  
565 of calcium signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (2012) 566-578.

566 [55] M. Crompton, S. Virji, V. Doyle, N. Johnson, J.M. Ward, The mitochondrial permeability  
567 transition pore, *Biochem Soc Symp*, 66 (1999) 167-179.

568 [56] T.R. Figueira, M.H. Barros, A.A. Camargo, R.F. Castilho, J.C. Ferreira, A.J. Kowaltowski, F.E.  
569 Sluse, N.C. Souza-Pinto, A.E. Vercesi, Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen  
570 species: from molecular mechanisms to human health, *Antioxid Redox Signal*, 18 (2013) 2029-  
571 2074.

572 [57] J.M. Baughman, F. Perocchi, H.S. Girgis, M. Plovanich, C.A. Belcher-Timme, Y. Sancak, X.R. Bao,  
573 L. Strittmatter, O. Goldberger, R.L. Bogorad, V. Kotliansky, V.K. Mootha, Integrative genomics  
574 identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter, *Nature*, 476  
575 (2011) 341-345.

576 [58] D. De Stefani, A. Raffaello, E. Teardo, I. Szabo, R. Rizzuto, A forty-kilodalton protein of the  
577 inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter, *Nature*, 476 (2011) 336-340.

578 [59] X. Pan, J. Liu, T. Nguyen, C. Liu, J. Sun, Y. Teng, M.M. Fergusson, Rovira, II, M. Allen, D.A.  
579 Springer, A.M. Aponte, M. Gucek, R.S. Balaban, E. Murphy, T. Finkel, The physiological role of  
580 mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter, *Nat Cell Biol*,  
581 15 (2013) 1464-1472.

582 [60] S. Marchi, P. Pinton, The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components,  
583 structure and physiopathological implications, *J Physiol*, 592 (2014) 829-839.

584 [61] D. Pendin, E. Greotti, T. Pozzan, The elusive importance of being a mitochondrial Ca(2+)  
585 uniporter, *Cell Calcium*, 55 (2014) 139-145.

586 [62] P. Bernardi, Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition  
587 pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane  
588 depolarization, *J Biol Chem*, 267 (1992) 8834-8839.

589 [63] R.F. Castilho, J.A. Vicente, A.J. Kowaltowski, A.E. Vercesi, 4,6-Dinitro-o-cresol uncouples  
590 oxidative phosphorylation and induces membrane permeability transition in rat liver  
591 mitochondria, *Int J Biochem Cell Biol*, 29 (1997) 1005-1011.

592 [64] A.J. Kowaltowski, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, Opening of the mitochondrial permeability  
593 transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca<sup>2+</sup> is dependent on  
594 mitochondrial-generated reactive oxygen species, FEBS Lett, 378 (1996) 150-152.  
595 [65] E.B. Zago, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, The redox state of endogenous pyridine nucleotides can  
596 determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the  
597 permeability transition pore, FEBS Lett, 478 (2000) 29-33.  
598 [66] P. Schonfeld, R. Bohnensack, Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by  
599 membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier, FEBS Lett, 420 (1997) 167-170.  
600 [67] M.R. Wieckowski, L. Wojtczak, Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is  
601 partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore, FEBS Lett, 423 (1998) 339-  
602 342.  
603 [68] M. Di Paola, P. Zaccagnino, C. Oliveros-Celis, M. Lorusso, Arachidonic acid induces specific  
604 membrane permeability increase in heart mitochondria, FEBS Lett, 580 (2006) 775-781.  
605 [69] L. Hagenfeldt, U. von Döbeln, E. Holme, J. Alm, G. Brandberg, E. Enocksson, L. Lindeberg, 3-  
606 Hydroxydicarboxylic aciduria--a fatty acid oxidation defect with severe prognosis, J Pediatr, 116  
607 (1990) 387-392.  
608  
609  
  
610  
  
611  
  
612

613 **Legends to figures**

614

615 **Fig. 1.** Effects of 3-hydroxytetradecanodioic (3HTDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA)  
616 and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on ADP-stimulated (state 3) (A), resting (state 4) (B),  
617 and uncoupled (CCCP-stimulated) (D) respiration, as well as respiratory control ratio  
618 (RCR) (C), using glutamate/malate as substrate. Panels E and F show the effects of 3HTA  
619 (100  $\mu\text{M}$ ) on resting (state 4) respiration in the presence of atractyloside (ATC, 30  $\mu\text{M}$ ) and  
620 guanosine diphosphate (GDP, 200  $\mu\text{M}$ ), respectively. Liver mitochondrial preparations  
621 (0.75 mg protein.  $\text{mL}^{-1}$ ) and 3HTDA, 3HTA or 3HPA (10-100  $\mu\text{M}$ ) were added to the  
622 incubation medium in the beginning of the assays. Controls were performed in the absence  
623 of fatty acids and ethanol (the final concentration of EtOH in the incubation medium was  
624 1%) was added to the incubation medium in the beginning of the assays. The reaction  
625 media contained 200  $\mu\text{M}$  EGTA. Values are means  $\pm$  standard deviation for three to six  
626 independent experiments and are expressed as percentage of control (Controls: (A) [ $\text{nmol}$   
627  $\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$ ]:  $69.02 \pm 11.94$ ; (B) [ $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$ ]:  $14.62 \pm$   
628  $3.58$ ; (C) [RCR]  $4.95 \pm 1.12$ ; (D) [ $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$ ]:  $53.40 \pm 13.18$ ; (E)  
629 [ $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$ ]:  $13.51 \pm 2.66$ ; (F) [ $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$ ]:  $11.92$   
630  $\pm 2.56$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared to controls. #### $P < 0.001$ ,  
631 compared to HTA (Duncan multiple range test).

632 **Fig. 2.** Effects of 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on  
633 ADP-stimulated (state 3) (A), resting (state 4) (B) and uncoupled (CCCP-stimulated) (D)  
634 respiration, as well as respiratory control ratio (RCR) (C), using succinate plus rotenone as  
635 substrate. Liver mitochondrial preparations (0.5 mg protein.  $\text{mL}^{-1}$ ) and various  
636 concentrations of 3HTA or 3HPA (10-100  $\mu\text{M}$ ) were added to the incubation medium in

637 the beginning of the assays. Controls were performed in the absence of fatty acids and  
638 ethanol (the final concentration of EtOH in the incubation medium was 1%) was added to  
639 the incubation medium in the beginning of the assays. The reaction media contained 200  
640  $\mu\text{M}$  EGTA. Values are means  $\pm$  standard deviation for three independent experiments and  
641 are expressed as percentage of control (Controls: (A) [ $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$ ]:  
642  $125.60 \pm 8.21$ ; (B) [ $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$ ]:  $34.55 \pm 3.91$ ; (C) [RCR]  $3.66 \pm 0.43$ ;  
643 (D) [ $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$ ]:  $116.75 \pm 17.95$ ).  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P <$   
644  $0.001$ , compared to controls (Duncan multiple range test).

645 **Fig. 3.** Effects of 3-hydroxytetradecanodioic (3HTDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA)  
646 and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on mitochondrial membrane potential in the presence  
647 (A-D) or absence (E) of  $\text{Ca}^{2+}$ . All experiments were performed in a reaction media  
648 containing mitochondrial preparations ( $0.5 \text{ mg protein} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) supported by  
649 glutamate/malate or succinate. (A) 3HTDA, 3HTA or 3HPA ( $30 \mu\text{M}$ , lines b-d) were added  
650 50 seconds after the beginning of the assay. (B) 3HTA ( $10\text{-}30 \mu\text{M}$ , lines b-d). (C) 3HTA  
651 ( $30 \mu\text{M}$ , lines b-f). Ruthenium red (RR,  $5 \mu\text{M}$ , line c), cyclosporin A (CsA,  $1 \mu\text{M}$ ) plus  
652 ADP ( $300 \mu\text{M}$ ) (line d), dithiothreitol (DTT,  $5 \text{ mM}$ ) (line e) or *N*-ethylmaleimide (NEM,  $20$   
653  $\mu\text{M}$ ) (line f) were added in the beginning of the assay. (D) 3HTA ( $30 \mu\text{M}$ , lines b-d).  
654 Ruthenium red (RR,  $1 \mu\text{M}$ , line c) and cyclosporin A (CsA,  $1 \mu\text{M}$ ) plus ADP ( $300 \mu\text{M}$ )  
655 (line d) were added in the beginning of the assay. (E) 3HTDA ( $100 \mu\text{M}$ , lines b), 3HTA  
656 ( $100 \mu\text{M}$ , lines c) and 3HPA ( $100 \mu\text{M}$ , lines d). Controls (line a) were performed in the  
657 absence of fatty acids. Panels A-D refer to mitochondrial preparations supplemented by  $30$   
658  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  150 seconds after the beginning of the assay, as indicated, whereas in panel E  
659 there was no exogenous  $\text{Ca}^{2+}$ . The reaction media contained  $30 \mu\text{M}$  (A-D) or  $100 \mu\text{M}$  (E)

660 EGTA. CCCP (3  $\mu$ M) was added in the end of the assays. Traces are representative of three  
661 independent experiments (animals) and were expressed as fluorescence arbitrary units  
662 (FAU). \*\*\* $P < 0.001$ , compared to controls (Duncan multiple range test).

663 **Fig. 4.** Effects of 3-hydroxytetradecanodioic (3HTDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA)  
664 and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on mitochondrial NAD(P)H content in the presence  
665 (A-C) or absence (D) of  $Ca^{2+}$ . All experiments were performed in a reaction media  
666 containing mitochondrial preparations (0.5 mg protein.  $mL^{-1}$ ) supported by  
667 glutamate/malate or succinate. (A) 3HTDA, 3HTA or 3HPA (30  $\mu$ M, lines b-d) were added  
668 50 seconds after the beginning of the assay. (B) 3HTA (30  $\mu$ M, lines b-d). Ruthenium red  
669 (RR, 5  $\mu$ M, line c) and cyclosporin A (CsA, 1  $\mu$ M) plus ADP (300  $\mu$ M) (line d) were added  
670 in the beginning of the assay. (C) 3HTA (30  $\mu$ M, lines b-d). Ruthenium red (RR, 1  $\mu$ M, line  
671 c) and cyclosporin A (CsA, 1  $\mu$ M) plus ADP (300  $\mu$ M) (line d) were added in the beginning  
672 of the assay. (D) 3HTDA (100  $\mu$ M, lines b), 3HTA (100  $\mu$ M, lines c) and 3HPA (100  $\mu$ M,  
673 lines d). Controls (line a) were performed in the absence of fatty acids. Panels A-C refer to  
674 mitochondrial preparations supplemented by 30  $\mu$ M  $Ca^{2+}$  150 seconds after the beginning  
675 of the assay, as indicated, whereas in panel D there was no exogenous  $Ca^{2+}$ . The reaction  
676 media contained 30  $\mu$ M (A-C) or 100  $\mu$ M (D) EGTA. CCCP (3  $\mu$ M) was added in the end  
677 of the assays. Traces are representative of three independent experiments (animals) and  
678 were expressed as fluorescence arbitrary units (FAU). \*\*\* $P < 0.001$ , compared to controls  
679 (Duncan multiple range test).

680 **Fig. 5.** Effects of 3-hydroxytetradecanodioic (3HTDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA)  
681 and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on mitochondrial swelling in the presence of  $Ca^{2+}$ . All  
682 experiments were performed in a reaction media containing mitochondrial preparations (0.5



683 mg protein. mL<sup>-1</sup>) supported by glutamate/malate. (A) 3HTDA, 3HTA or 3HPA (30 μM,  
684 lines b-d) were added 50 seconds after the beginning of the assay. (B) 3HTA (30 μM, lines  
685 b-d). Ruthenium red (RR, 5 μM, line c) and cyclosporin A (CsA, 1 μM) plus ADP (300  
686 μM) (line d) were added in the beginning of the assay. Controls (line a) were performed in  
687 the absence of fatty acids. All traces refer to mitochondrial preparations supplemented by  
688 40 μM Ca<sup>2+</sup> 150 seconds after the beginning of the assay, as indicated. Alamethicin (Alm,  
689 40 μg/mg of protein) was added at the end of the measurements. Traces are representative  
690 of three independent experiments (animals). \*\*\**P* < 0.001, compared to controls (Duncan  
691 multiple range test).

692 **Fig. 6.** Effects of 3-hydroxytetradecanodioic (3HTDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA)  
693 and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> retention capacity. All  
694 experiments were performed in a reaction media containing mitochondrial preparations (0.5  
695 mg protein. mL<sup>-1</sup>) supported by glutamate/malate or succinate. (A) 3HTDA, 3HTA or  
696 3HPA (30 μM, lines b-d) were added in the beginning of the assay. (B) 3HTA (10-30 μM,  
697 lines b-d). (C) 3HTA (30 μM, lines b-c). Cyclosporin A (CsA, 1 μM, line c) were added in  
698 the beginning of the assay. (D) 3HTA (30 μM, lines b). Controls (line a) were performed in  
699 the absence of fatty acids. All traces refer to mitochondrial preparations supplemented by  
700 20 μM Ca<sup>2+</sup> 50 seconds after the beginning of the assay, as indicated. CCCP (3 μM) was  
701 added in the end of the assays. Traces are representative of three independent experiments  
702 (animals) and were expressed as fluorescence arbitrary units (FAU).

703

704

705

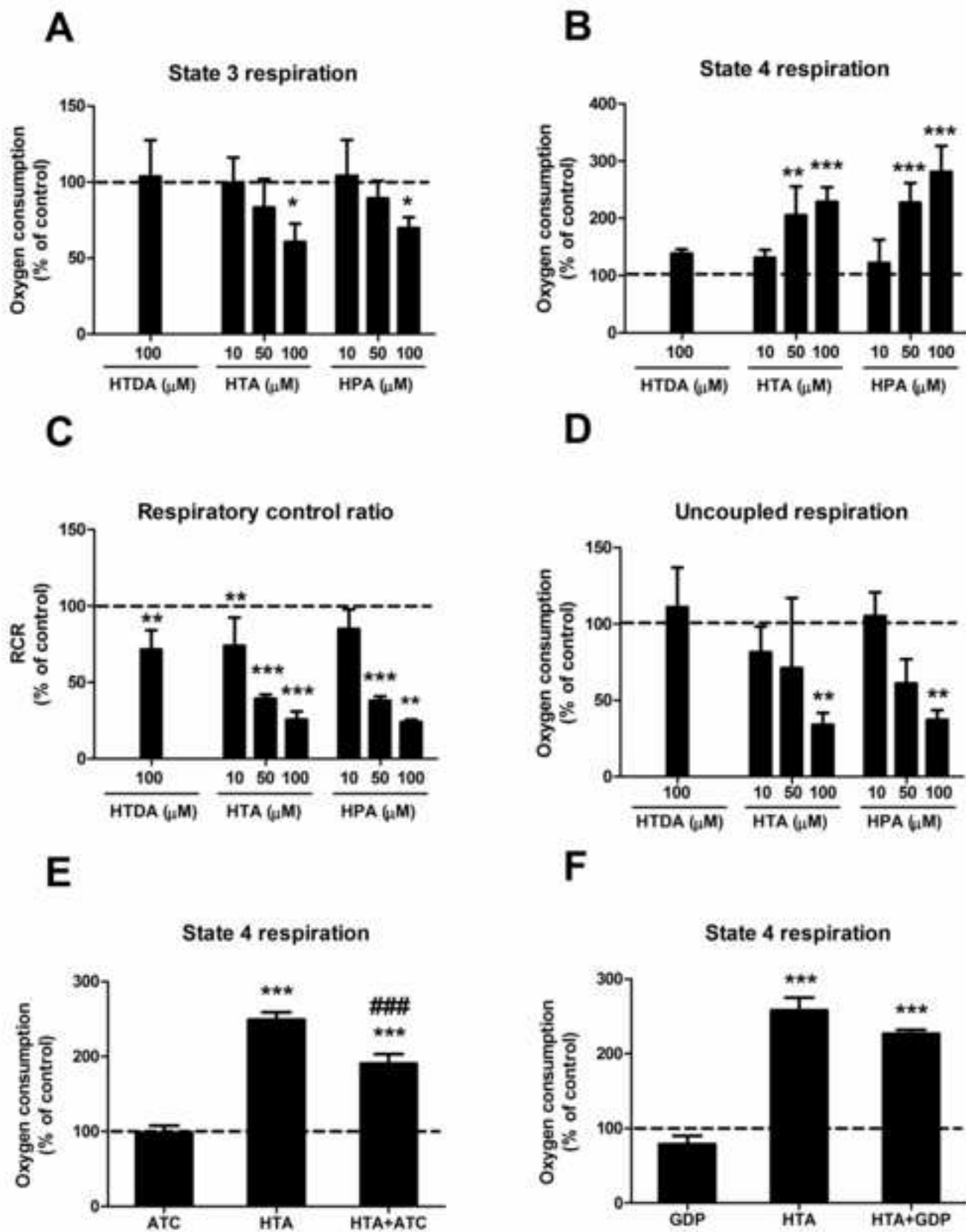
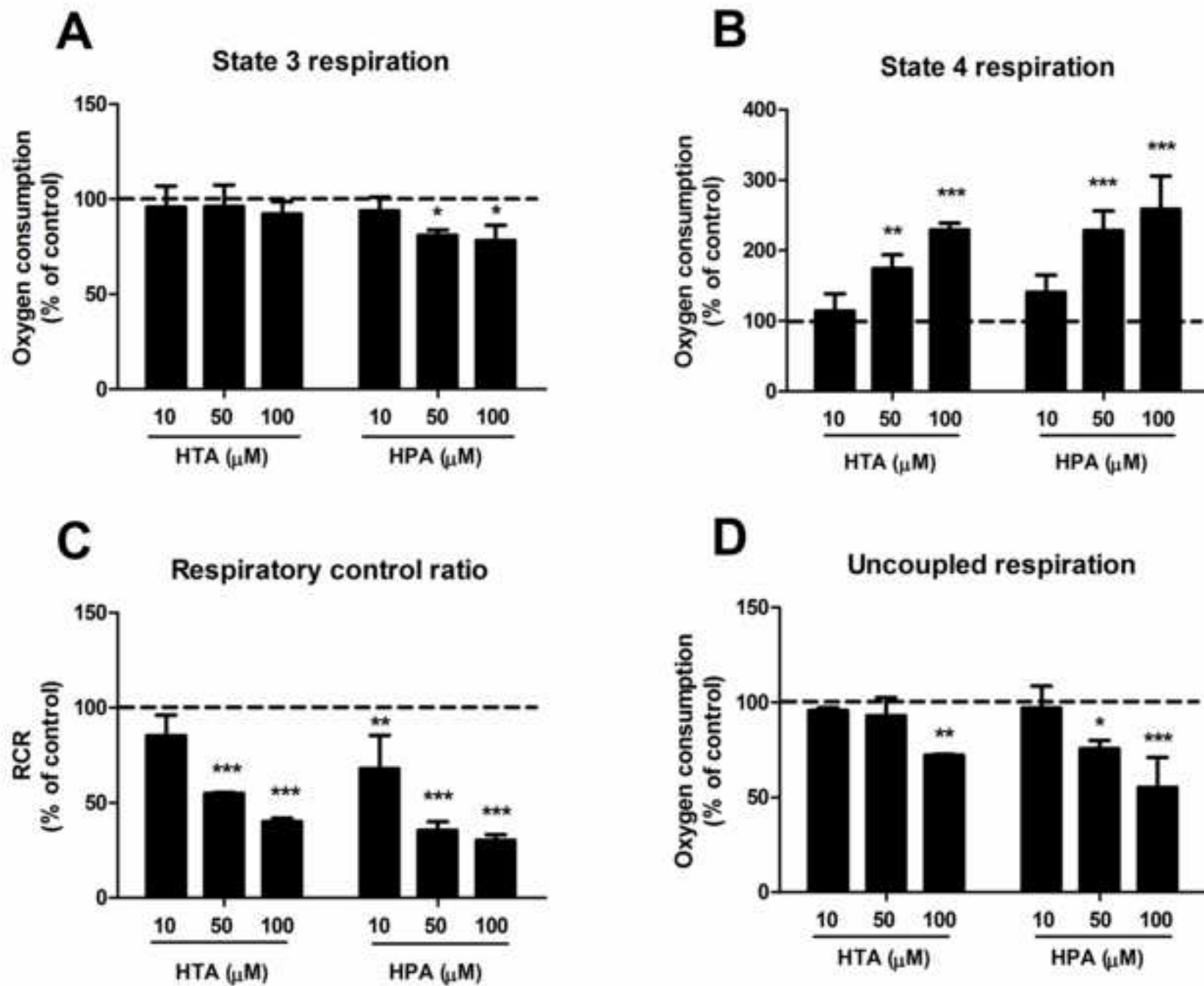


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)



**Figure 3**  
[Click here to download high resolution image](#)

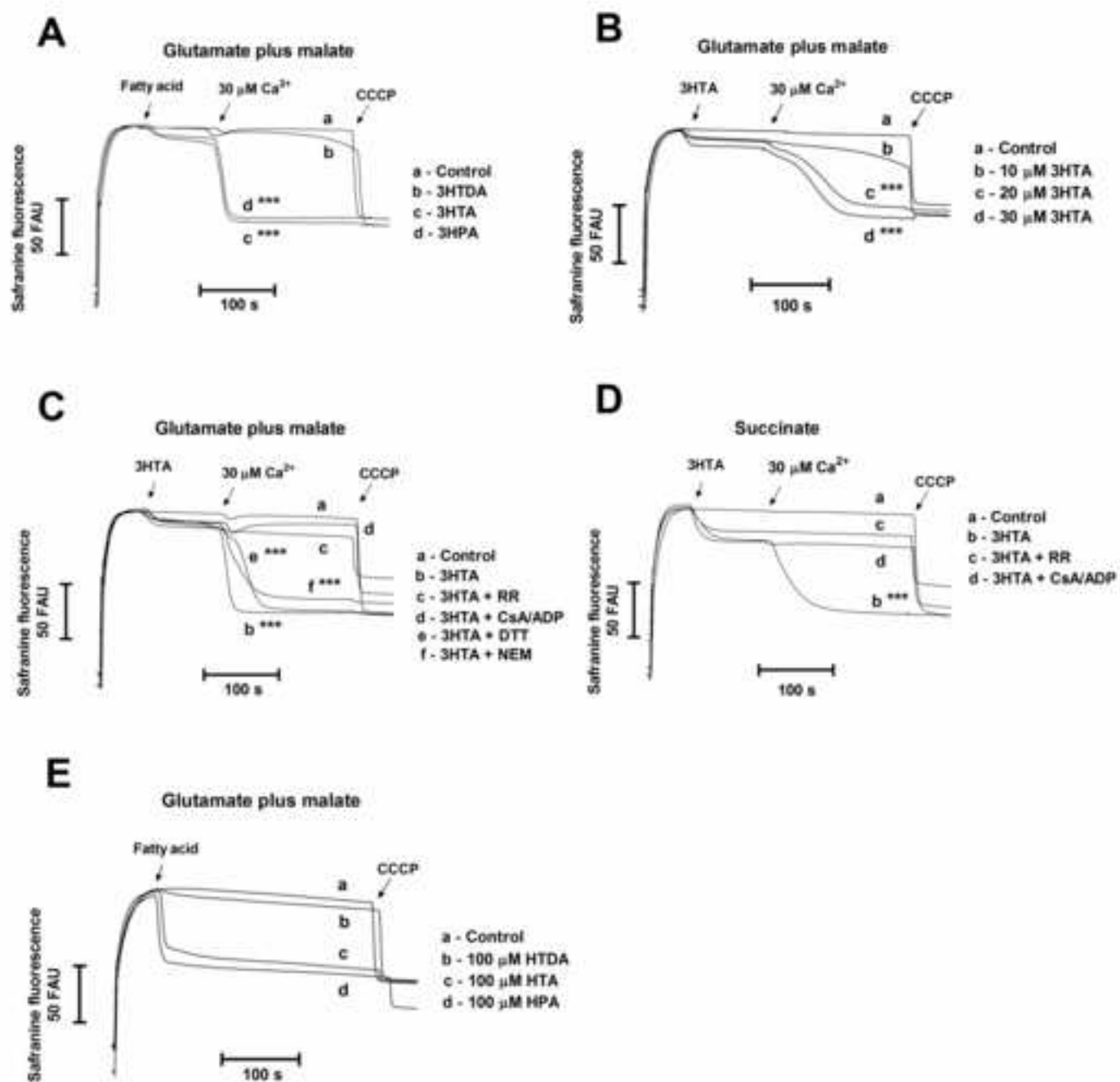
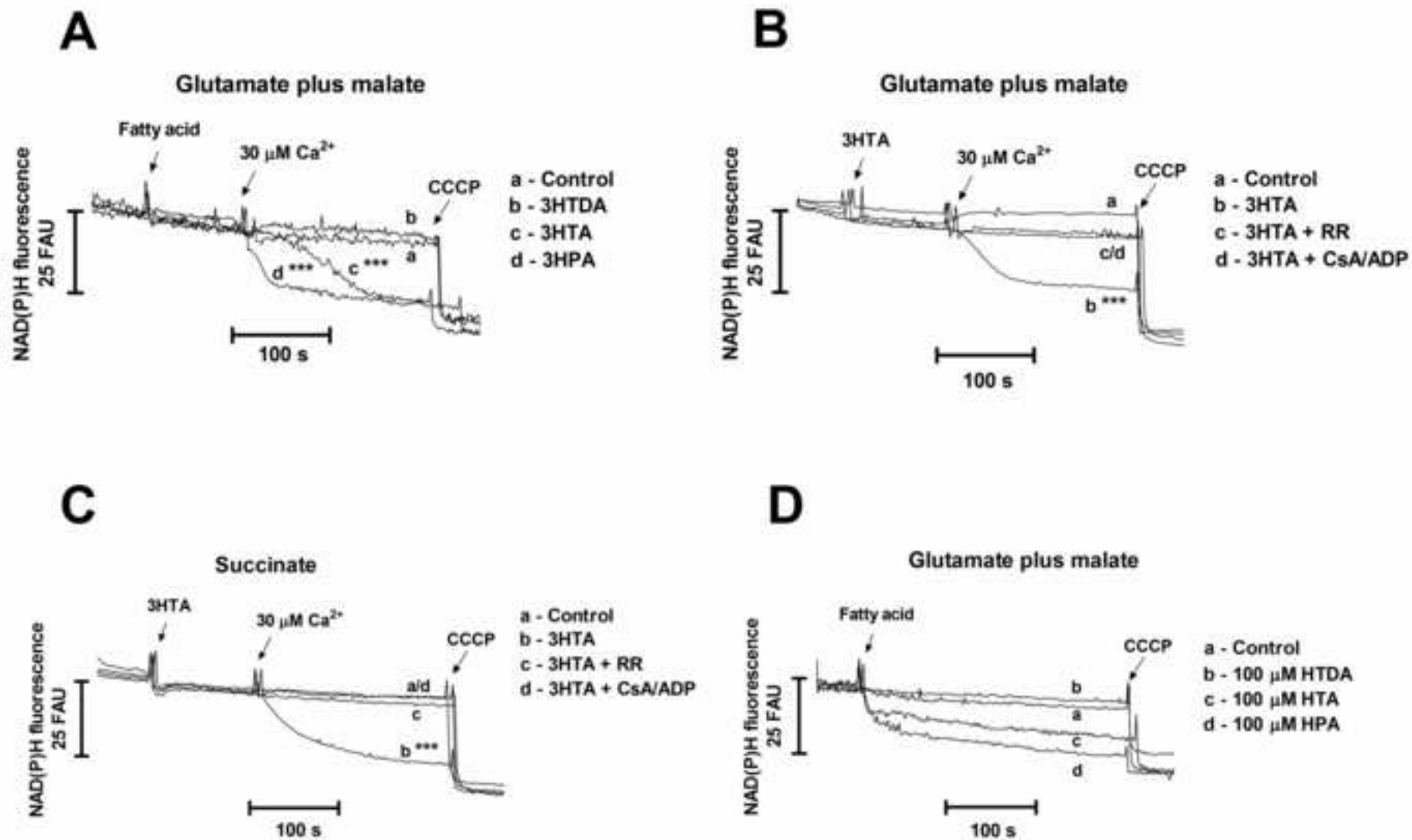


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)



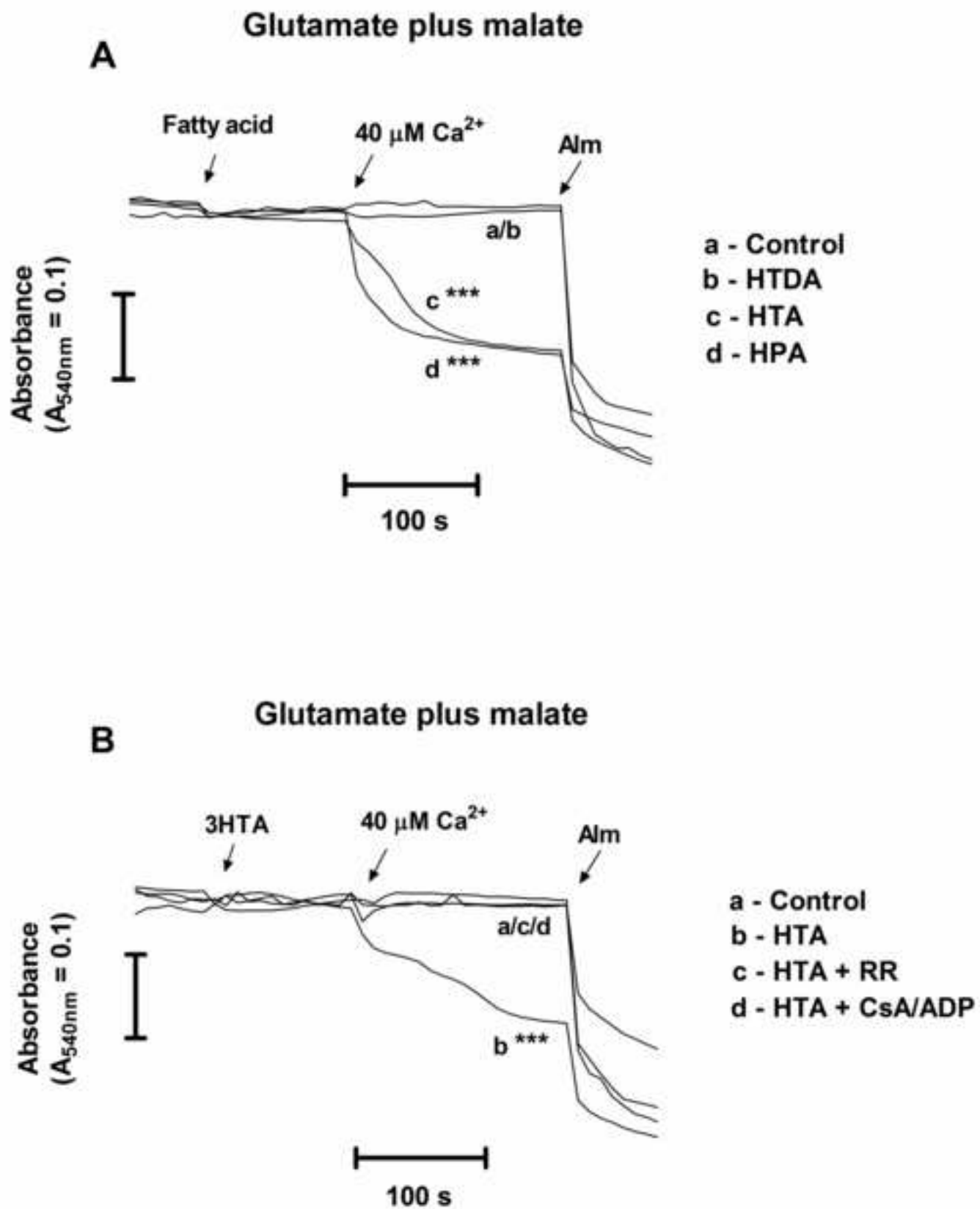
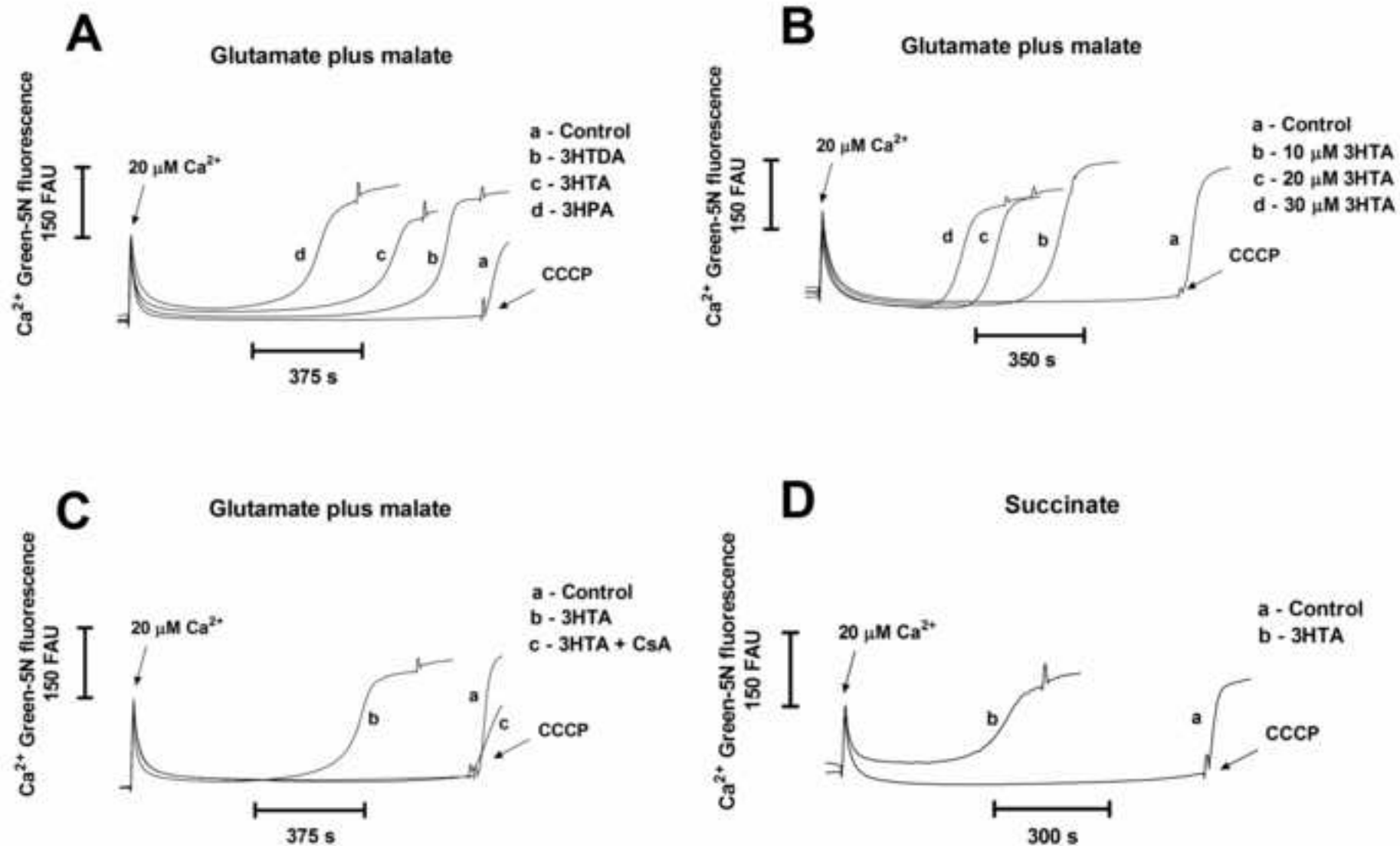


Figure 6  
[Click here to download high resolution image](#)



## **PARTE III**

### ***Discussão, Conclusões e Perspectivas***



### III.1. DISCUSSÃO

A deficiência da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia longa hidroxilada (LCHAD) é uma doença genética relativamente frequente da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Pacientes afetados podem apresentar durante a infância progressão clínica rápida com sintomas severos, como insuficiência hepática, coma e mesmo morte súbita usualmente desencadeados por jejum ou catabolismo (Sykut-Cegielska et al., 2011). Outros sinais clínicos são convulsão, letargia, microcefalia, cardiomiopatia, alterações musculares, rabdomiólise e retinopatia (Onkenhout et al., 1995; Rinaldo et al., 1998; Roe and Ding, 2001; Spiekerkoetter U., 2004). A literatura descreve alguns trabalhos relativos a ação dos metabólitos ácidos acumulados nessa doença sobre o cérebro, mas a fisiopatologia do dano hepático apresentado por estes pacientes ainda não está estabelecida.

Nesse particular, enfatize-se que a oxidação de ácidos graxos é a principal fonte de energia do fígado, que os utiliza em maior quantidade em situações de catabolismo, como jejum prolongado e doenças (Graber et al., 1994). Durante essas situações, há uma maior mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo para a corrente circulatória e uma parte considerável dos mesmos é usualmente metabolizada no fígado. Como há um bloqueio na rota metabólica devido ao defeito enzimático, a espiral da  $\beta$ -oxidação não pode ser completada e então há o acúmulo de metabólitos intermediários dessa rota em pacientes com deficiência da LCHAD, especialmente nesse órgão, particularmente os ácidos 3HTA e o 3HPA.

Por outro lado, durante os episódios sintomáticos de descompensação metabólica os pacientes com essa doença apresentam hipoglicemia hipocetótica, acidemia láctica, pequeno aumento dos níveis de amônia, bem como de transaminases e creatina quinase no plasma, sugerindo um comprometimento hepático com disfunção mitocondrial e alteração do metabolismo energético celular. Tendo em vista que os ácidos graxos aumentados na deficiência da LCHAD foram demonstrados serem tóxicos para o cérebro e coração de ratos (Tonin et al., 2010a e b, 2013), assim que resolvemos estudar a toxicidade dos mesmos no fígado de ratos jovens, medindo parâmetro de metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de fígado.

De uma forma geral, verificamos neste trabalho que várias funções mitocondriais foram afetadas pelos principais hidróxiácidos de cadeia longa acumulados na deficiência da LCHAD (3HTA e 3HPA) em fígado de ratos, enquanto que o análogo

dicarboxílico do 3HTA, 3HTDA, não alterou os parâmetros analisados. Assim, a capacidade mitocondrial de retenção de cálcio foi comprometida por 3HTA e 3HPA, prejudicando a homeostase celular do cálcio. Os mesmos metabólitos também alteraram a bioenergética mitocondrial agindo como desacopladores, inibidores metabólicos e indutores do poro de transição mitocondrial.

O primeiro passo do nosso estudo foi avaliar os efeitos do 3HTA e 3HPA sobre os parâmetros de respiração mitocondrial, medidos através do consumo de oxigênio por preparações mitocondriais usando glutamato e malato ou succinato como substratos. 3HTA e 3HPA diminuíram tanto o estado 3 quanto o estado desacoplado nas doses a partir de 50  $\mu\text{M}$ , mostrando que eles se comportam como inibidores metabólicos. Por outro lado, o estado 4 foi estimulado e o RCR diminuído por esses ácidos graxos, indicando que eles também agem como desacopladores.

Ácidos graxos de cadeia longa são descritos como desacopladores da fosforilação oxidativa. O mecanismo desse efeito se deve ao seu transporte na forma não dissociada para a matrix mitocondrial pela bicamada lipídica da membrana mitocondrial e pelo efluxo mitocondrial na forma dissociada por difusão facilitada por proteínas, como ANT e UCP (Schonfeld et al., 1989 e 1992). Substâncias inibidoras destas duas proteínas podem ser utilizadas com o intuito de desvendar os mecanismos envolvidos. Estudos demonstraram que o ATC, um inibidor do ANT, previne em parte o efeito desacoplador induzido por ácido palmítico em mitocôndrias de músculo esquelético de ratos (Mokhova et al., 2005) e também que o GDP prejudica o transporte de ácidos graxos pela UCP (Goglia et al., 2003; Affourtit et al., 2007). Neste contexto, verificamos que o ATC foi capaz de prevenir parcialmente o efeito desacoplador do 3HTA observado no estado 4 da respiração mitocondrial, enquanto que o GDP não foi capaz de preveni-lo, sugerindo então um envolvimento do ANT no efeito desacoplador do 3HTA.

Outros parâmetros foram avaliados, tais como a medida do potencial de membrana e do conteúdo de NAD(P)H mitocondrial na presença de 100  $\mu\text{M}$  de 3HTA e 3HPA. Os dois hidroxiácidos graxos (3HTA e 3HPA) diminuíram tanto o  $\Delta\Psi\text{m}$  quanto o conteúdo de NAD(P)H, reforçando o efeito desacoplador encontrado nos parâmetros respiratórios. Este mecanismo desacoplador pode estar relacionado com a acidemia láctica encontrada nos pacientes e com as anormalidades mitocondriais observada nos pacientes com deficiência da LCHAD (Amirkhan et al., 1997, Tyni e Pihko, 1999).

Verificamos ainda que o 3HTA e o 3HPA em concentrações baixas (10-30  $\mu\text{M}$ ), diminuíram marcadamente o  $\Delta\Psi\text{m}$  na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, o inibidor do transportador uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , rutênio vermelho (RR) (Moore et al., 1971) foi capaz de inibir esta dissipação do  $\Delta\Psi\text{m}$ . Ciclosporina A (CsA), inibidor do PTP via inativação da ciclofilina D (uma das proteínas componentes do PTP) associada ao ADP, que inibe a abertura do PTP se ligando ao ANT, também foram capazes de prevenir totalmente a diminuição do  $\Delta\Psi\text{m}$  provocado pelo 3HTA. Tomados em seu conjunto, estes dados sugerem um envolvimento tanto do  $\text{Ca}^{2+}$  quanto do PTP neste efeito.

Outra maneira pela qual pode ocorrer a indução do PTP é pelo ataque oxidativo de espécies reativas a grupamentos tióis das proteínas componentes do PTP levando à sua abertura. Entretanto, o potente agente redutor DTT e o protetor de grupamentos tióis NEM foram capazes de prevenir a diminuição no  $\Delta\Psi\text{m}$  induzidas pelo 3HTA, excluindo então como causa o estresse oxidativo.

Também foi avaliado o efeito de 3HTA, 3HPA sobre o conteúdo mitocondrial de NAD(P)H na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . Verificamos que o 3HTA e o 3HPA diminuíram significativamente o conteúdo de NAD(P)H da matrix mitocondrial e que o RR e a associação CsA mais ADP previniram esse redução, o que novamente demonstra um envolvimento do PTP e do  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta diminuição pode ser devido a uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna subsequente a abertura do PTP. A diminuição do conteúdo de NAD(P)H também pode ser explicada pela alto consumo de NADH devido a ativação do fluxo de elétrons pela cadeia respiratória após a abertura do PTP (Kowaltowski et al, 2001; Le-Quoc et al, 1989; Kehrer et al, 1994).

A indução do PTP e posterior permeabilização seletiva da membrana mitocondrial interna podem levar ao inchamento mitocondrial. Assim, foi avaliado o efeito do 3HTA e 3HPA no inchamento mitocondrial. Os dois ácidos provocaram um grande inchamento após a adição de  $\text{Ca}^{2+}$ , e foi totalmente prevenido por CsA mais ADP e por RR, confirmando o envolvimento do PTP. A abertura do PTP também pode causar a perda de elementos mitocondriais, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , glutatona, NADH e NADPH e também fatores pró-apoptóticos como citocromo c, podendo levar a apoptose ou necrose, assim como prejuízo na fosforilação oxidativa e síntese de ATP (Zoratti et al, 1995; Starkov et al, 2010; Rasola et al, 2011; Bernardi et al, 2012; Rizzuto et al, 2012, Crompton et al, 1999; Figueira et al, 2013).

Neste trabalho também foi demonstrado que os ácidos graxos aqui estudados comprometeram a captação e a retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. O tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$  realizado pela mitocôndria e pelo retículo endoplasmático é de extrema importância para o funcionamento correto da célula (Baughman et al, 2011; De Stefani et al, 2011; Pan et al, 2013; Marchi et al, 2014; Pendin et al, 2014). Este efeito foi novamente prevenido por CsA, indicando que a incapacidade de captação do  $\text{Ca}^{2+}$  está envolvida com o PTP.

É importante destacar que todos os experimentos foram feitos também com o análogo dicarboxílico do 3HTA, o 3-hidroxitetradecanodioico (3HTDA) e que este não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros estudados, mostrando então uma especificidade dos efeitos aos ácidos que mais se acumulam na deficiência da LCHAD, os monocarboxílicos. Uma explicação para isso pode ser por o 3HTDA ser mais polar que os monocarboxílicos e por isso apresenta maior dificuldade de cruzar a membrana mitocondrial interna por difusão, possível mecanismo do 3HTA e 3HPA. Entretanto, mais estudos seriam necessários para explicar o motivo pelo qual ele não altera os parâmetros estudados.

Um mecanismo já estudado de indução do PTP é associado com o desacoplamento da fosforilação oxidativa (Bernardi et al, 1992; Castilho et al, 1997; Kowaltowski 1996; Zago et al, 2000) e é este mecanismo que se acredita estar ocorrendo com o 3HTA e o 3HPA. Uma outra alternativa, considerando que o efeito desacoplador encontrado no estado 4 da respiração foi atenuado pelo ATC, pode-se presumir que o 3HTA age também se ligando à parte citosólica do ANT, o que causa permeabilização não-seletiva (Schonfeld et al, 1997; Wieckowski et al, 1998; Di Paola et al, 2006).

Anteriormente foi estudado em nosso laboratório estas substâncias em mitocôndrias de cérebro (Tonin et al, 2010a e 2014) e é importante destacar que em fígado os efeitos foram mais pronunciados e já significativos em doses menores, mostrando então uma menor sensibilidade do fígado à estas substâncias. Podemos especular então que esta maior vulnerabilidade do fígado em relação ao cérebro, pode estar associada aos graves sintomas hepáticos, quando comparados com os sintomas neurológicos que os pacientes apresentam (Moczulski et al, 2009; Rocchiccioli et al, 1990; Amirkhan et al, 1997; Tyni et al, 1997).

Outra hipótese sobre a maior vulnerabilidade do fígado em relação ao cérebro, se deve ao fato de o fígado ter um intenso metabolismo de ácidos graxos, tanto de síntese quanto de degradação, causando uma maior concentração de ácidos graxos no tecido hepático comparado com outros tecidos, inclusive o cérebro.

Neste trabalho foi demonstrado que mesmo concentrações baixas ( $10\mu\text{M}$ ) de ácido graxos monocarboxílicos hidroxilados são capazes de alterar importantes parâmetros da bioenergética mitocondrial, como  $\Delta\Psi\text{m}$  e inchamento mitocondrial na presença de cálcio, efeitos que foram completamente prevenidos por CsA mais ADP e por RR, demonstrando envolvimento do PTP nestes efeitos. É importante ressaltar que esta concentração é similar ou ainda menor do que a concentração plasmática apresentada por pacientes durante crises de descompensação metabólica, que causam uma piora significativa dos sintomas hepáticos (Costa et al,1998; Hagenfeldt et al,1990). Estas crises que ocorrem são secundárias a infecções e levam a um acelerado catabolismo, aumentando a quantidade de ácidos graxos circulantes (Hagenfeldt et al,1990).

Concluindo, foi apresentado neste trabalho pela primeira vez que os principais metabólitos acumulados na deficiência da LCHAD agem como desacopladores, inibidores metabólicos, indutores do PTP e prejudicam a homeostase do cálcio em mitocôndrias de fígado. Ainda, como a produção de ATP está intimamente ligada ao potencial de membrana (Nicholls et al, 2004), é presumível que como as substâncias estudadas prejudicam a manutenção do  $\Delta\Psi\text{m}$ , a produção de energia também esteja diminuída. Sendo assim, é provável que o desequilíbrio da bioenergética e homeostase mitocondrial demonstrado nesse trabalho está associado ao dano hepático apresentado pelos pacientes afetados pela deficiência da LCHAD. Finalmente, acredita-se que inibidores da transição de permeabilidade mitocondrial podem ser de possível uso na terapia de prevenção ao dano hepático nestes pacientes.

### III.2 CONCLUSÕES

- O 3HTA e o 3HPA, mas não o 3HTDA, aumentam o estado 4 e diminuem o estado 3, a respiração desacoplada, assim como o RCR de maneira dose dependente, tanto usando glutamato/malato quanto succinato como substratos, sugerindo um efeito desacoplador destes metabólitos.
- O ANT atenuou em 30% o aumento do estado 4 causado pelo 3HTA na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , enquanto o GDP não atenuou este efeito, sugerindo um envolvimento do ANT no aumento do estado 4.
- O 3HTA e o 3HPA, mas não o 3HTDA (100  $\mu\text{M}$ ), dissiparam drasticamente o potencial de membrana mitocondrial, reforçando o efeito desacoplador destes ácidos graxos.
- 3HTA e 3HPA em baixas concentrações (10-30  $\mu\text{M}$ ), dissiparam o  $\Delta\Psi\text{m}$  na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . RR e CsA mais ADP preveniu esse efeito, enfatizando o envolvimento do  $\text{Ca}^{2+}$ . Em contraste, DTT e NEM não foram capazes de prevenir, deixando improvável o envolvimento de espécies reativas neste efeito. 3HTDA não foi capaz de alterar esses parâmetros.
- 3HTA e 3HPA (100  $\mu\text{M}$ ), mas não 3HTDA (100  $\mu\text{M}$ ), provocaram uma diminuição no conteúdo de NAD(P)H mitocondrial, que pode ser secundário ao efeito desacoplador induzido por esses ácidos graxos.
- 3HTA e 3HPA em baixas concentrações (30  $\mu\text{M}$ ) também diminuem o conteúdo de NAD(P)H na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , e este efeito foi prevenido por CsA mais ADP e RR, levando a crer que este efeito pode estar ocorrendo devido a abertura do PTP. 3HTDA não alterou este parâmetro.
- 30  $\mu\text{M}$  de 3HTA e 3HPA, mas não de 3HTDA, provocaram inchamento mitocondrial na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizando glutamato/malato ou succinato como substrato. RR e CsA mais ADP foram capazes de prevenir este efeito.
- 3HTA e 3HPA (10-30  $\mu\text{M}$ ) reduziram significativamente a capacidade de retenção de cálcio mitocondrial, efeito que foi prevenido por CsA. 3HTDA não alterou este parâmetro.

### **III.3.PERSPECTIVAS**

1. Investigar os efeitos in vitro dos ácidos orgânicos hidroxilados de cadeia longa acumulados na LCHAD sobre a homeostase energética no músculo esquelético e coração de ratos jovens.
2. Investigar os efeitos in vitro dos ácidos orgânicos hidroxilados de cadeia longa acumulados na LCHAD sobre a homeostase redox no fígado e coração de ratos jovens.
3. Investigar os efeitos da administração in vivo intracerebroventricular dos ácidos orgânicos hidroxilados de cadeia longa acumulados na LCHAD sobre parâmetros da bioenergética e homeostase redox em várias estruturas cerebrais de ratos jovens.

### III.4 REFERÊNCIAS

Abeles RH, Frey PA, Jenks WP. *Biochemistry*, 1992. London: Jones and Bartlett, 603-632.

Adam-Vizi V and AA Starkov. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *J Alzheimers Dis*, 2010. 20 Suppl 2: p. S413-26.

Affourtit C, Crichton PG, Parker N, Brand MD. Novel uncoupling proteins. *Novartis Found Symp*, 2007; 287: 70-80; discussion 80-91.

Amaral AU, Cecatto C, Busanello EN, Ribeiro CA, Melo DR, Leipnitz G, Castilho RF, Wajner M. Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport. *Mol Genet Metab*, 2012. 105(1): p. 84-90.

Amirkhan RH, Timmons CF, Brown KO, *et al.* Clinical, biochemical, and morphologic investigations of a case of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Pathol Lab Med*, 1997; 121: 730-734.

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 2005. 434(7033): p. 658-62.

Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem*, 2005. 280(19): p. 18558-61.

Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 2011; 476: 341-345.

Beal MF. Mitochondria and neurodegeneration. *Novartis Found Symp*, 2007; 287:183-92.



Ben-Shachar D, Karry R. Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *PLoS ONE*, 2008; 3:e3676.

Bernardi P, The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol*, 2013. 4: p. 95.

Bernardi P, von Stockum S. The permeability transition pore as a Ca(2+) release channel: new answers to an old question. *Cell Calcium*, 2012; 52: 22-27.

Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem*, 1992; 267: 8834-8839.

Budd, SL e DG Nicholls. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 1996. 67(6): p. 2282-91.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 2000; 29:222-30.

Castilho RF, Vicente JA, Kowaltowski AJ, Vercesi AE. 4,6-Dinitro-o-cresol uncouples oxidative phosphorylation and induces membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997; 29: 1005-1011.

Castilho RF, Hansson O, Ward MW, Budd SL, Nicholls DG. Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci*, 1998. 18(24): p. 10277-86.

Costa CG, Dorland L, de Almeida IT, *et al.* The effect of fasting, long-chain triglyceride load and carnitine load on plasma long-chain acylcarnitine levels in mitochondrial very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 1998; 21: 391-399

Costa CG, Guérand WS, Struys EA, Holwerda U, ten Brink HJ, Tavares de Almeida I, Duran M, Jakobs C. Quantitative analysis of urinary acylglycines for the diagnosis of beta-oxidation defects using GC-NCI-MS. *J Pharm Biomed Anal*, 2000; 21: 1215-24.

Crompton M, Virji S, Doyle V, *et al.* The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp*, 1999; 66: 167-179.

Das AM, Fingerhut R, Wanders RJ, Ullrich K. Secondary respiratory chain defect in a boy with long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: possible diagnostic pitfalls. *Eur J Pediatr*, 2000; 159, 243-246.

De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011; 476: 336-340.

den Boer, M.E., Wanders, R.J., Morris, A.A., L, I.J., Heymans, H.S., Wijburg, F.A. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. *Pediatrics*, 2002; 109, 99-104.

Di Donato S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis*, 2000; 23:247– 263.

Di Paola M, Zaccagnino P, Oliveros-Celis C, Lorusso M. Arachidonic acid induces specific membrane permeability increase in heart mitochondria. *FEBS Lett*, 2006; 580: 775-781.

Egidio RJ, Francis GL, Coates PM, Hale DE, Roesel A. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Am. Fam. Physician*, 1989. 39, 221-226.

Ferreira GC, Tonin A, Schuck PF, Viegas CM, Ceolato PC, Latini A, Perry ML, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM, Vargas CR, Wajner M. Evidence for a synergistic action of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids disturbing rat brain energy metabolism. *Int J Dev Neurosci*, 2007.25:391-8.

Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JC, Kowaltowski AJ, Sluse FE, Souza-Pinto NC, Vercesi AE. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid Redox Signal*, 2013. 18(16): p. 2029-74.

Friberg H and T Wieloch. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochimie*, 2002. 84(2-3): p. 241-50.

Gardner A, Salmaso D, Nardo D, Micucci F, Nobili F, Sanchez-Crespo A, Jacobsson H, Larsson SA, Pagani M. Mitochondrial function is related to alterations at brain SPECT in depressed patients. *CNS Spectr*, 2008. 13:805-814.

Gil JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci*, 2008; 28:2156.

Goglia F, Skulachev VP. 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 J*, 2003; 17: 1585-1591.

Graber, R., Sumida, C., Nunez, E.A., Fatty acids and cell signal transduction. *Journal of lipid mediators and cell signalling*, 1994; 9, 91-116.

Hagenfeldt L, von Döbeln U, Holme E, Alm J, Brandberg G, Enocksson E, Lindeberg L. 3-Hydroxydicarboxylic aciduria – a fatty acid oxidation defect with severe prognosis. *J Pediatr*, 1990; 116(3): 387-92.

Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J*, 2001 353:411-6.

Hoek JB e J Rydstrom. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem J*, 1988. 254(1): p. 1-10.

Jones PM, Quinn R, Fennessey PV, Tjoa S, Goodman SI, Fiore S, Burlina AB, Rinaldo P, Boriack RL, Bennet MJ. Improved stable isotope dilution-gas-chromatography-mass spectrometry method for serum or plasma free 3-hydroxy-fatty acids and its utility for the study of disorders of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Clinical chemistry*, 2000; 46:148-155.

Kehrer JP, Lund LG. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 1994; 17: 65-75.

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*, 2001; 495: 12-15.

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca<sup>2+</sup> is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett*, 1996; 378: 150-152.

Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab*, 2005; 86:188-99.

Lehninger AL, Vercesi AE, Bababunmi EA. Regulation of Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. 75(4): p. 1690-4.

Le-Quoc D, Le-Quoc K. Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 1989; 273: 466-478.

Lieberman MA and Marks AD. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical approach, 4<sup>th</sup> ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996; 86:147-57.

Maciel EN, Kowaltowski AJ, Schwalm FD, Rodrigues JM, Souza DO, Vercesi AE, Wajner M, Castilho RF. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca<sup>2+</sup> and respiratory chain complex II inhibition. *J Neurochem*, 2004. 90(5): p. 1025-35

Marchi S, Pinton P. The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *J Physiol*, 2014; 592: 829-839.

Mirandola SR, Melo DR, Schuck PF, Ferreira GC, Wajner M, Castilho RF. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J Inherit Metab Dis*, 2008; 31:44-54.

Mirandola SR, Melo DR, Saito A, Castilho RF. 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J Neurosci Res*, 2010. 88(3): p. 630-9.

Moczulski D, Majak I, Mamczur D. An overview of beta-oxidation disorders. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2009; 63: 266-277.

Mokhova EN, Khailova LS. Involvement of mitochondrial inner membrane anion carriers in the uncoupling effect of fatty acids. *Biochemistry (Mosc)*, 2005; 70: 159-163.

Moore CL. Specific inhibition of mitochondrial Ca<sup>++</sup> transport by ruthenium red. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971; 42: 298-305.

Moshal KS, Metreveli N, Frank I, Tyagi SC. Mitochondrial MMP activation, dysfunction and arrhythmogenesis in hyperhomocysteinemia. *Curr Vasc Pharmacol*, 2008; 6:84-92.

Murphy AN, G Fiskum, and MF Beal, Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999. 19(3): p. 231-45.

Nelson DL, COX MM. Lehninger Principles of biochemistry. 3<sup>a</sup> ed. New York: Worth Publishers, 623-721, 2000.

Nicholls D, Akerman K. Mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta*, 1982 683:57-88.

Nicholls DG, Ferguson SJ. The Chemiostatic proton circuit In: Bioenergetics 3 (Nicholls DG, Ferguson SJ, eds), 57-87. Academic Press, London, 2002.

Nicholls DG. Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell*, 2004; 3: 35-40.

Nieminen AL, Petrie TG, Lemasters JJ, Selman WR., Cyclosporin A delays mitochondrial depolarization induced by N-methyl-D-aspartate in cortical neurons: evidence of the mitochondrial permeability transition. *Neuroscience*, 1996. 75(4): p. 993-7.

Onkenhout W, Venizelos V, van der Poel PFH, Van der Heuvel MPM, Poorthuis BJHM. Identification and quantification of intermediates of unsaturated fatty acid metabolism in plasma of patients with fatty acid oxidation disorders. *Clin Chem*, 1995; 41:1467–74.

Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, Fergusson MM, Rovira II, Allen M, Springer DA, Aponte AM, Gucek M, Balaban RS, Murphy E, Finkel T. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol*, 2013; 15: 1464-1472.

Pendin D, Greotti E, Pozzan T. The elusive importance of being a mitochondrial Ca(2+) uniporter. *Cell Calcium*, 2014; 55: 139-145.

Petersen A, Castilho RF, Hansson O, Wieloch T, Brundin P. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition and activation of caspases in calcium ionophore A23187-induced death of cultured striatal neurons. *Brain Res*, 2000. 857(1-2): p. 20-9.41

Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, 2011; 50: 222-233.

Reddy PH, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*, 2008; 14:45-53.

Regenold WT, Phatak P, Marano CM, Sassan A, Conley RR, Kling MA. Elevated cerebrospinal fluid lactate concentrations in patients with bipolar disorder and schizophrenia: implications for the mitochondrial dysfunction hypothesis. *Biol Psychiatry*, 2009; 65:489-494.

Reis de Assis D, Maria RC, Borba Rosa R, Schuck PF, Ribeiro CA, da Costa Ferreira G, Dutra-Filho CS, Terezinha de Souza Wyse A, Duval Wannmacher CM, Santos Perry ML, Wajner M. Inhibition of energy metabolism in cerebral cortex of young rats by the medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency. *Brain Res*, 2004; 1030:141-151.

Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry ML, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res*, 2008; 33:114-24.

Rinaldo P, Raymond K, Al-Odaib A, Bennett M. Clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders. *Curr Opin Pediatr*, 1998;10:615–621.

Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders. *Ann Rev Physiol*, 2002; 64:477-502,.

Rizzuto, R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13(9): p. 566-78.

Rocchiccioli F, Wanders RJ, Aubourg P, *et al.* Deficiency of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: a cause of lethal myopathy and cardiomyopathy in early childhood. *Pediatr Res*, 1990; 28: 657-662.

Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds), 1909–1963, New York: McGraw-Hill, New York, 2001.

Rottenberg H e M Marbach. Adenine nucleotides regulate Ca<sup>2+</sup> transport in brain mitochondria. *FEBS Lett*, 1989. 247(2): p. 483-6.

Sander J, Sander S, Steuerwald U, Janzen N, Peter M, Wanders RJ, Marquardt I, Korenke GC, Das AM. Neonatal screening for defects of the mitochondrial trifunctional protein. *Mol Genet Metab*, 2005; 85(2):108-14.

Sasaki S, Horie Y, Iwata M. Mitochondrial alterations in dorsal root ganglion cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 2007;114:633-9.

Schindler AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*, 1996. 16(19): p. 6125-33.

Schonfeld P, Bohnensack R. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Lett*, 1997; 420: 167-170.

Schonfeld P, Schild L, Kunz W. Long-chain fatty acids act as protonophoric uncouplers of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1989; 977: 266-272.

Schonfeld P. Anion permeation limits the uncoupling activity of fatty acids in mitochondria. *FEBS Lett*, 1992; 303: 190-192.

Schuck PF, Leipnitz G, Ribeiro CA, Dalcin KB, Assis DR, Barschak AG, Pulrolnik V, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M. Inhibition of creatine kinase activity *in vitro* by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochem Res*, 2002; 27:1633-9.

Shao L, Martin MV, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Bunney WE, Vawter MP. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Ann Med*, 2008;40:281-295.

Smith CM, Marks AD, Lieberman MA. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, 2<sup>a</sup> ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Spiekerkoetter, U., Khuchua, Z., Yue, Z., Bennett, M.J., Strauss, A.W.. General mitochondrial trifunctional protein (TFP) deficiency as a result of either alpha- or beta-subunit mutations exhibits similar phenotypes because mutations in either subunit alter TFP complex expression and subunit turnover. *Pediatr Res*, 2004; 55, 190-196.

Starkov AA. The molecular identity of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> sequestration system. *FEBS J*, 2010; 277: 3652-3663.

Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci*, 1998. 1(5): p. 366-73.

Sykut-Cegielska J, Gradowska W, Piekutowska-Abramczuk D, Andresen BS, Olsen RKJ, Ołtarzewski M, Pronicki M, Pajdowska M, Bogdańska A, Jabłońska E,



Radomyska B, Kuśmierska K, Krajewska-Walasek M, Gregersen N, and Pronicka E. Urgent metabolic service improves survival in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency detected by symptomatic identification and pilot newborn screening. *J Inherit Metab Dis*, 2011. 34:185–195

Tanveer A, Virji S, Andreeva L, Totty NF, Hsuan JJ, Ward JM, Crompton M et al., Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca<sup>2+</sup> and oxidant stress. *Eur J Biochem*, 1996. 238(1): p. 166-72.

Tonin AM, Amaral AU, Busanello EN, et al. Mitochondrial bioenergetics deregulation caused by longchain 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? *Biochim Biophys Acta*, 2014; 1842: 1658-1667.

Tonin AM, Amaral AU, Busanello EN, Grings M, Castilho RF, Wajner M. Long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and mitochondrial trifunctional protein deficiencies uncouple oxidative phosphorylation in heart mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2013; 45, 47-57.

Tonin AM, Ferreira GC, Grings M, Viegas CM, Busanello EN, Amaral AU, Zanatta A, Schuck PF, Wajner, M. Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain. *Life Sci*, 2010a; 86, 825-831.

Tonin AM, Grings M, Busanello EN, Moura AP, Ferreira GC, Viegas CM, Fernandes CG, Schuck PF, Wajner M. Long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies induce oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int*, 2010b; 56, 930-936.

Tyni T, Pihko H. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatr*, 1999; 88, 237-245.

Tyni T, Rapola J, Paetau A, Palotie A, Pihko H. Pathology of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency caused by the G1528C mutation. *Pediatr Pathol Lab Med*, 1997; 17: 427-447.

Uchino H, Elmér E, Uchino K, Li PA, He QP, Smith ML, Siesjö BK. Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res*, 1998; 812(1-2): p. 216-26.

Ushikubo S, Aoyama T, Kamijo T, Wanders RJ, Rinaldo P, Vockley J, Hashimoto T. Molecular characterization of mitochondrial trifunctional protein deficiency: formation of the enzyme complex is important for stabilization of both alpha- and beta-subunits. *Am J Hum Genet*, 1996; 58(5): 979-88.

Ventura FV, Ruiter J, Ijlst L, de Almeida IT, Wanders RJ. Differential inhibitory effect of long-chain acyl-CoA esters on succinate and glutamate transport into rat liver mitochondria and its possible implications for long-chain fatty acid oxidation defects. *Mol Genet Metab*, 2005; 86, 344-352.

Ventura FV, Ruiter JP, Ijlst L, de Almeida IT, Wanders RJ. Lactic acidosis in long-chain fatty acid beta-oxidation disorders. *J Inher Metab Dis*, 1998; 21, 645-654.

Ventura FV, Tavares de Almeida I, Wanders RJ. Inhibition of adenine nucleotide transport in rat liver mitochondria by long-chain acyl-coenzyme A beta-oxidation intermediates. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007; 352, 873-878.

Viegas CM, da Costa Ferreira G, Schuck PF, Tonin AM, Zanatta A, de Souza Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM, Wajner M. Evidence that 3-hydroxyisobutyric acid inhibits key enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of young rats. *Int J Dev Neurosci*, 2008; 26:293-9.

Walker V. Inherited organic acid disorders. In: Clayton BE, Round JM, eds. *Clinical Biochemistry and the Sick Child*. 131–43, Oxford: Blackwell, 1994.

Wanders RJ, Vreken P, den Boer ME, Wijburg FA, van Gennip AH, Ijlst L. Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation. *J Inher Metab Dis*, 1999; 22(4):442-87.

Wang JF. Defects of mitochondrial electron transport chain in bipolar disorder: implications for mood-stabilizing treatment. *Can J Psychiatry*, 2007; 52:753-762.

Wang Y, Mohsen AW, Mihalik SJ, Goetzman ES, Vockley J. Evidence for physical association of mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative phosphorylation complexes. *J Biol Chem*, 2010; 285, 29834-29841.

Wieckowski MR, Wojtczak L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett*, 1998; 423: 339-342.

Zago EB, Castilho RF, Vercesi AE. 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 Lett*, 2000; 478: 29-33.

Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*, 1995; 1241: 139-176.

Zugno AI, Scherer EB, Schuck PF, Oliveira DL, Wofchuk S, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. Intrastratial administration of guanidinoacetate inhibits Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and creatine kinase activities in rat striatum. *Metab Brain Dis*, 2006; 21:41-50,