

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

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DE ERROS
INATOS DO METABOLISMO DO ENXOFRE EM CÉREBRO DE RATOS E
FIBROBLASTOS HUMANOS E POTENCIAIS ESTRATÉGIAS
TERAPÊUTICAS**

MATEUS GRINGS

ORIENTADOR: PROF. DR. GUILHIAN LEIPNITZ

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas - Bioquímica como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor
em Bioquímica.

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Grings, Mateus

Investigação de mecanismos fisiopatológicos de erros inatos do metabolismo do enxofre em cérebro de ratos e fibroblastos humanos e potenciais estratégias terapêuticas / Mateus Grings. -- 2018. 175 f.

Orientador: Guilhian Leipnitz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Deficiência da sulfito oxidase. 2. Deficiência da ETHE1. 3. Sulfito. 4. Tiosulfato. 5. Cérebro. I. Leipnitz, Guilhian, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

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

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e à CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche.

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

Ao Prof. Dr. Moacir Wajner, por todo o apoio e ensinamentos durante os últimos 10 anos e por deixar as portas do seu laboratório sempre abertas.

À Prof. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse, por todo o incentivo e colaboração.

Ao Prof. Dr. Jerry Vockley da Universidade de Pittsburgh, por me permitir passar por essa experiência fantástica durante meu doutorado sanduíche e por todo o conhecimento compartilhado.

Ao meu orientador e também grande amigo Prof. Dr. Guilhian Leipnitz, por todos os ensinamentos, paciência, incentivo e por estar sempre disponível quando precisei de ajuda.

Aos colegas do laboratório 27 e aos alunos de iniciação científica que por ele passaram durante os últimos anos, por toda a colaboração na realização desse e de outros trabalhos.

Em especial, à Bel e à Alana, meus braços direitos, por toda a ajuda, convívio dentro e fora do laboratório, risadas, piadas internas, transmissões de pensamento e pela grande amizade que criamos. Sem elas a realização desse trabalho teria sido muito mais complicada.

A todos os colegas do laboratório 38, atuais e passados, por estarem sempre dispostos a ajudar e por tornarem a convivência no laboratório muito mais divertida. Sinto muito carinho por todos.

À Bianca, pela amizade e por toda fundamental ajuda dentro e fora do laboratório, principalmente durante esse último ano.

Aos meus amigos de Pittsburgh, em especial ao Luis e a Gilda, por toda a convivência e por me ajudarem a relaxar nos períodos de folga.

Aos colegas de laboratório do Children`s Hospital em Pittsburgh, principalmente a Anu e a Lina, que não mediram esforços para me ajudar sempre que precisei.

Aos meus amigos da Bio, pela grande amizade construída nos últimos anos e pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos de Nova Petrópolis, pela grande amizade mantida durante muitos anos e por ajudarem a recarregar as minhas energias.

À minha namorada Dani, por todo amor que cresce cada vez mais, amizade, companheirismo e compreensão.

À família da minha namorada, por me receber sempre tão bem e torcer por mim.

À minha tia Clarise, por todo o carinho e auxílio.

Aos meus avós, que se foram durante esse período, por sempre me incentivarem e rezarem por mim.

Ao meu irmão Martin e à minha cunhada Lu, pelos conselhos e pelos momentos de descontração que passamos juntos.

Aos meus pais Nestor e Gladis, que são a minha base, por todo amor, incentivo e por serem exemplo de determinação, responsabilidade e educação.

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
I.1. INTRODUÇÃO	6
I.1.1 Erros inatos do metabolismo	6
I.1.2 Catabolismo de aminoácidos sulfurados	7
I.1.3 Metabolismo energético	18
I.1.4 Homeostase mitocondrial	20
I.1.5 Radicais Livres e Defesas Antioxidantes	22
I.1.6 Compostos protetores.....	24
I.2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	26
I.2.1 Justificativa e objetivo geral	26
I.2.2 Objetivos específicos	27
PARTE II	30
Capítulo I.....	31
Capítulo II.....	44
Capítulo III.....	59
Capítulo IV	94
PARTE III	131

III.1. DISCUSSÃO	132
III.2. CONCLUSÕES.....	155
III.3. PERSPECTIVAS.....	157
REFERÊNCIAS.....	158

PARTE I

Introdução e Objetivos

RESUMO

O sulfito e o tiosulfato encontram-se acumulados na deficiência da sulfito oxidase (SO), ao passo que o tiosulfato também se acumula na deficiência da proteína da encefalopatia etilmalônica 1 (ETHE1). Os pacientes apresentam principalmente encefalopatia progressiva e convulsões neonatais graves, resultando geralmente em morte prematura. Neste estudo, investigamos os efeitos *in vivo* do sulfito em estruturas encefálicas de ratos com deficiência da SO, e da administração intraestriatal de sulfito e tiosulfato em ratos normais sobre a homeostase redox e mitocondrial. Também avaliamos alterações nesses parâmetros em fibroblastos de pacientes. Inicialmente, observamos que o sulfito diminuiu os níveis de GSH e as atividades da glutatona redutase (GR) e glutatona S-transferase (GST) no córtex cerebral, e da GST no cerebelo de animais deficientes para a SO. Além disso, o sulfito aumentou as atividades dos complexos II e II-III em estriado e do complexo II no hipocampo, mas diminuiu a atividade do complexo IV no estriado de animais com deficiência da SO. Nesses animais, o sulfito também reduziu o potencial de membrana mitocondrial no córtex cerebral e no estriado, além de diminuir as atividades da malato e glutamato desidrogenase. Já nos animais que receberam injeção intraestriatal de sulfito ou tiosulfato, ambos os compostos diminuíram as atividades da creatina cinase e da citrato sintase, enquanto que o sulfito reduziu a massa mitocondrial. O sulfito ainda diminuiu os níveis de GSH e as atividades da glutatona peroxidase (GPx), GR, GST e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), enquanto que o sulfito e o tiosulfato aumentaram a atividade da catalase. O sulfito também diminuiu os níveis nucleares de PGC-1 α e induziu reatividade glial e dano neuronal. As alterações causadas pelo sulfito foram prevenidas pelo tratamento com bezafibrato. Por fim, nos estudos realizados em fibroblastos, utilizamos células de quatro pacientes com deficiência da ETHE1 e de um paciente com deficiência da SO. Observamos diminuição da respiração mitocondrial em todos os tipos celulares, e diminuição de ATP em duas linhagens com deficiência da ETHE1 e na linhagem com deficiência da SO. Também verificamos alterações variáveis no conteúdo de proteínas de dinâmica mitocondrial, e uma diminuição do conteúdo de proteínas envolvidas na comunicação entre retículo endoplasmático (RE) e mitocôndria. Um aumento nos níveis de DDIT3, marcadora de estresse de RE, na produção de superóxido e apoptose também foram verificados em todos os tipos celulares. O tratamento com JP4-039, um antioxidante mitocondrial, diminuiu os níveis de superóxido em todas as linhagens celulares e aumentou a respiração mitocondrial em duas linhagens com deficiência da ETHE1 e na linhagem com deficiência da SO. Os achados deste trabalho evidenciam que alterações na homeostase energética e redox, na biogênese e dinâmica mitocondrial, bem como na comunicação entre mitocôndria e RE são mecanismos patológicos envolvidos nas deficiências da SO e da ETHE1. Além disso, visto que o bezafibrato e o JP4-039 exerceram efeitos protetores nos diferentes modelos, pode ser sugerido que esses compostos são promissores para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as deficiências da SO e da ETHE1.

Palavras chave: Deficiência da sulfito oxidase; deficiência da ETHE1; sulfito; tiosulfato; cérebro; homeostase redox; função mitocondrial.

ABSTRACT

Sulfite and thiosulfate are accumulated in tissues of patients affected by sulfite oxidase (SO) deficiency, whereas thiosulfate also accumulates in the deficiency of ethylmalonic encephalopathy protein 1 (ETHE1). Patients present progressive encephalopathy and severe neonatal seizures, often resulting in early childhood death. In this study, we investigated the effects of sulfite in encephalic structures of SO-deficient rats, and of an intrastriatal injection of sulfite or thiosulfate in normal rats on redox and mitochondrial homeostasis. We also investigated possible alterations in these parameters in fibroblasts of patients. Initially, we observed that sulfite decreased reduced glutathione (GSH) levels and the activities of glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) in cerebral cortex, and of GST in cerebellum of SO deficient rats. Moreover, sulfite increased the activities of the respiratory chain complexes II and II-III in striatum and of complex II in hippocampus, whereas complex IV activity was decreased in striatum of SO deficient animals. In these animals, sulfite also reduced mitochondrial membrane potential in the cerebral cortex and in the striatum, as well as inhibited the activities of malate and glutamate dehydrogenase in cerebral cortex. Regarding the rats that received sulfite or thiosulfate via intrastriatal injection, both compounds reduced creatine kinase and citrate synthase activities, while sulfite decreased mitochondrial mass. Sulfite also decreased GSH levels and the activities of glutathione peroxidase (GPx), GR, GST, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), whereas both sulfite and thiosulfate increased catalase activity. In addition, sulfite decreased PGC-1 α nuclear levels and induced glial reactivity and neuronal damage. Bezafibrate prevented the alterations induced by sulfite in striatum. Finally, in the experiments with fibroblasts, we used four cell lines with ETHE1 deficiency and one cell line with SO deficiency. We observed a decrease in basal and maximal respiration in all cell lines, and ATP depletion in two ETHE1 deficient cell lines and in the SO deficient fibroblasts. We also verified variable alterations in the content of proteins involved in mitochondrial dynamics, and a decrease in the content of proteins involved in endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria communication. Increased content of DDIT3, an ER stress marker, as well as high levels of superoxide and apoptosis induction were further seen in all cell lines. Treatment with the mitochondria-targeted free radical scavenger JP4-039 decreased superoxide levels in all cells lines and increased basal and maximal respiration in two ETHE1 deficient cell lines and in the SO deficient cells. Our findings provide evidence that alterations in energy and redox homeostasis, mitochondrial biogenesis and dynamics, as well as in the communication between mitochondria and ER are pathological mechanisms involved in the SO and ETHE1 deficiencies. Furthermore, since bezafibrate and JP4-039 exerted protective effects, it may be suggested that these compounds are attractive agents for the development of new therapeutic strategies aiming to improve the prognosis of patients affected by SO and ETHE1 deficiency.

Keywords: Sulfite oxidase deficiency; ETHE1 deficiency; sulfite; thiosulfate; brain; redox homeostasis; mitochondrial function.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-MST - 3-mercaptopiruvato sulfotransferase
AAT - aspartato aminotransferase
AL - ácido lipoico
ALP - alopurinol
APO - apocinina
CAC - ciclo do ácido cítrico
CAT - catalase
CBS - cistationina β -sintase
CDO - cisteína dioxigenase
CK - creatina cinase
CoQ - coenzima Q
COX - citocromo c oxidase
cPMP - piranopterinina monofosfato cíclica
CS - citrato sintase
CSE - γ -cistationase
CT - cisteína aminotransferase
CTE - cadeia transportadora de elétrons
DRP1 - proteína relacionada à dinamina 1
DTT - ditioneítrito
EE - encefalopatia etilmalônica
EIM - erros inatos do metabolismo
EMA - ácido etilmalônico
ERN - espécies reativas de nitrogênio
ERO - espécies reativas de oxigênio
ERR α - receptor α relacionado a estrógeno
ETHE1 - proteína da encefalopatia etilmalônica 1
G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH - glutamato desidrogenase
GFAP - proteína fibrilar glial ácida
GPx - glutatona peroxidase
GR - glutatona redutase
Grp75 - proteína de 75 kDa regulada por glicose
Grp78 - proteína de 78 kDa regulada por glicose
GSH - glutatona reduzida
GSS $^{\cdot-}$ - perssulfeto
GSSG - glutatona oxidada
GST - glutatona S-transferase
IDH - isocitrato desidrogenase
IP3R - receptor do inositol 1,4,5-trifosfato
ISOD - deficiência isolada da sulfito oxidase
MAMs - membranas associadas à mitocôndria
mARC 1 - componente redutor da amidoxima mitocondrial
MDH - malato desidrogenase
MEL - melatonina
MFN1 e 2 - mitofusina 1 e 2
MME - membrana mitocondrial externa
MMI - membrana mitocondrial interna
MoCD - deficiência do cofator molibdênio

MoCo - cofator molibdênio
MOCS1 - proteína de síntese do cofator molibdênio 1
MPT - transição da permeabilidade mitocondrial
NAC - N-acetilcisteína
NeuN - proteína nuclear específica de neurônios
NRF - fator respiratório nuclear
ONOO⁻ - peroxinitrito
OPA1 - proteína atrofica óptica 1
PGC-1 α - co-ativador 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ
PPAR - receptor ativado por proliferador de peroxissomo
RE - retículo endoplasmático
S100B - proteína B de ligação ao cálcio S100
SCAD - desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta
SDH - succinato desidrogenase
SNC - sistema nervoso central
SO - sulfito oxidase
SOD - superóxido dismutase
SQR - sulfeto quinona oxidoreductase
TRO - trolox
TST - tiosulfato enxofre transferase
VDAC1 - canal seletivo de ânions dependente de voltagem 1
 $\Delta\Psi_m$ - potencial de membrana mitocondrial

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1 Erros inatos do metabolismo

Os erros inatos do metabolismo (EIM), descritos pela primeira vez pelo médico inglês Sir Archibald E. Garrod em 1908, são um grupo de doenças genética e fenotipicamente heterogêneas causadas por defeitos genéticos que levam à perda parcial ou total da atividade de uma enzima de uma determinada rota metabólica. Como consequência do bloqueio dessa via, há o acúmulo de intermediários potencialmente tóxicos nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes, além de uma possível depleção de produtos essenciais ao organismo (Bickel, 1987; Mak et al., 2013).

Embora sejam individualmente raros, coletivamente os EIM alcançam uma incidência de aproximadamente 1 a cada 500-1.000 recém-nascidos vivos. Mais de 600 EIM já foram descritos até o presente momento, sendo que esse número vem crescendo regularmente. Avanços no entendimento da etiologia molecular e bioquímica de EIM através de técnicas desenvolvidas nos últimos anos têm levado a um significativo progresso na detecção e tratamento dessas condições (Alfadhel et al., 2013; Beaudet et al., 2014; Scriver et al., 2001; Vernon, 2015). É importante ressaltar que o diagnóstico precoce através da triagem neonatal fornece a oportunidade de detectar os EIM durante o período pré-sintomático, permitindo a intervenção médica e uma possível melhora na história natural da doença (Vernon, 2015). Entretanto, como muitas dessas condições ainda carecem de testes diagnósticos específicos e sensíveis além de tratamentos eficazes, torna-se importante o estudo mais aprofundado da fisiopatologia do dano tecidual dessas doenças, de novos métodos diagnósticos e estratégias terapêuticas.

I.1.2 Catabolismo de aminoácidos sulfurados

A Figura 1 mostra a via do catabolismo dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína. A metionina é catabolizada à cisteína através de uma série de reações nas vias de transmetilação e transulfuração. Na via de transulfuração, as enzimas cistationina β -sintase (CBS) e γ -cistationase (CSE) são responsáveis por controlar o fluxo de enxofre entre seus intermediários homocisteína, cistationina e cisteína. Já o catabolismo da cisteína pode ocorrer através de duas vias: não-oxidativa e oxidativa. Na via não-oxidativa, há a formação de sulfeto de hidrogênio (H_2S), o qual pode ser produzido tanto através de reações catalisadas pelas enzimas CBS e CSE, como por exemplo a conjugação de homocisteína e cisteína, quanto por uma via envolvendo as enzimas cisteína aminotransferase (CT) e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3-MST). O H_2S é subsequentemente metabolizado na mitocôndria, onde é oxidado pela enzima sulfeto quinona oxidoreductase (SQR) e conjugado com sulfito (SO_3^{2-}), resultando na produção de tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$). A enzima tiosulfato enxofre transferase (TST) regenera o sulfito a partir do tiosulfato utilizando uma molécula de glutathiona reduzida (GSH) e produzindo um persulfeto (GSS^-), o qual também é convertido a sulfito pela proteína da encefalopatia etilmalônica 1 (ETHE1), uma enxofre dioxigenase. O sulfito pode ser então conjugado a H_2S para formar tiosulfato ou oxidado a sulfato pela enzima sulfito oxidase (SO) em uma reação que ocorre no espaço intermembranas mitocondrial. A SO depende de um cofator molibdênio (MoCo) para a sua atividade, sendo esse sintetizado a partir de GTP (Di Meo et al., 2015; Jackson et al., 2012; Schwarz et al., 2009; Viscomi et al., 2010). Embora a existência desta via de catabolismo do H_2S seja conhecida há mais de 20

anos (Powell e Somero, 1986), as enzimas que nela atuam e seus passos detalhados foram apenas elucidados há alguns anos atrás (Hildebrandt e Grieshaber, 2008) e recentemente refinados (Jackson et al., 2012). Entretanto, ainda há certos detalhes que não estão esclarecidos. Em relação à via oxidativa do catabolismo da cisteína, os produtos finais são o sulfato e a taurina. Nessa via, a enzima cisteína dioxigenase (CDO) oxida a cisteína produzindo cisteína-sulfinato, uma molécula que pode ser descaboxilada para formar hipotaurina, e, conseqüentemente, taurina, ou ser convertida a β -sulfinil-piruvato em uma reação catalisada pela enzima aspartato aminotransferase (AAT). O β -sulfinil-piruvato é decomposto a piruvato e sulfito na mitocôndria. Em condições oxidantes, a cisteína pode sofrer dimerização formando cistina, a qual pode reagir com sulfito dando origem a S-sulfocisteína (Di Meo et al., 2015; Jackson et al., 2012; Schwarz et al., 2009; Viscomi et al., 2010).

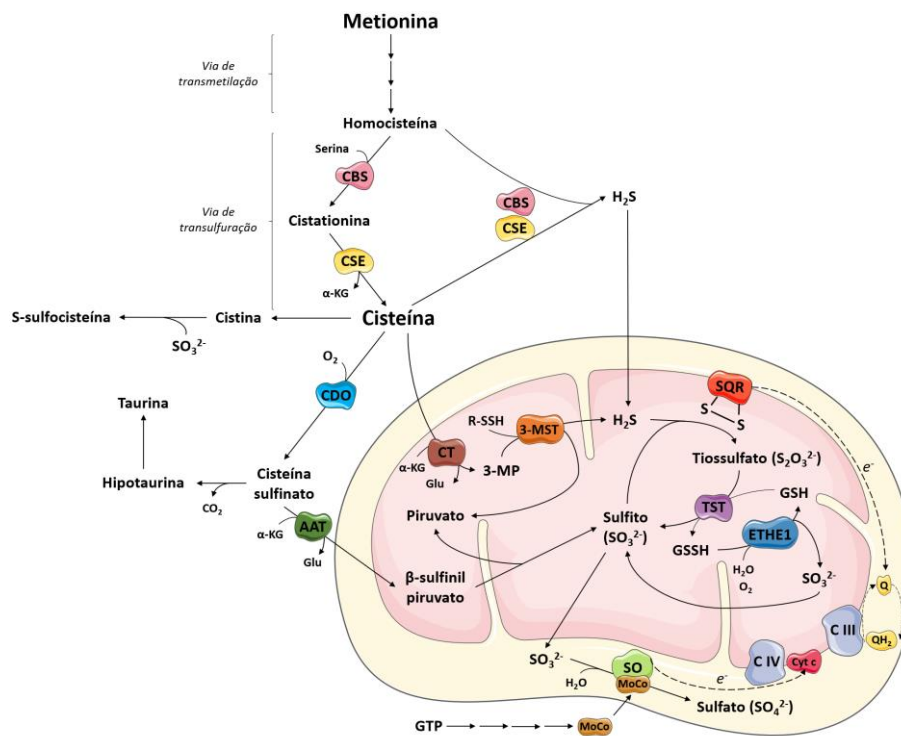


Figura 1. Via de catabolismo de aminoácidos sulfurados.

I.1.2.1 Sulfito oxidase (SO)

A enzima SO (EC 1.8.3.1) está localizada no espaço intermembranas da mitocôndria na maioria dos tecidos de mamíferos, incluindo o cérebro, e catalisa a oxidação do sulfito a sulfato (Figura 1) (Hobson et al., 2005; Johnson, 2003). Além de atuar na rota de degradação da metionina e da cisteína, essa enzima possui um importante papel na detoxificação do sulfito proveniente de fontes exógenas, uma vez que esse composto e derivados são amplamente utilizados como conservantes em alimentos e medicamentos (Chapman, 1993; Derin et al., 2006; Gunnison e Palmes, 1973; Taylor et al., 1986). Essa enzima mantém os níveis plasmáticos de sulfito em até 10 μM (Ji et al., 1995).

A SO é um homodímero com massa molecular de aproximadamente 110 kDa, sendo cada monômero dividido em três domínios, um heme citocromo b_5 , um domínio de ligação do MoCo e um domínio C-terminal responsável pela dimerização (Kisker et al., 1997). O MoCo é composto por uma molécula de molibdopterina ligada a molibdênio, sendo esse responsável pela oxidação do sulfito com a redução do molibdênio (VI) para o molibdênio (IV). Os dois elétrons provenientes do sulfito são subsequentemente transferidos um de cada vez através do heme citocromo b_5 para o citocromo c na cadeia respiratória (Johnson e Duran, 2001; Klein e Schwarz, 2012; Wilson e Rajagopalan, 2004). Uma vez que o organismo é incapaz de reciclar o MoCo e seus precursores provenientes da dieta, esse cofator necessita ser sintetizado *de novo* a partir de uma molécula de GTP por uma via biossintética de quatro passos enzimáticos (Schwarz, 2005) (Figura 2).

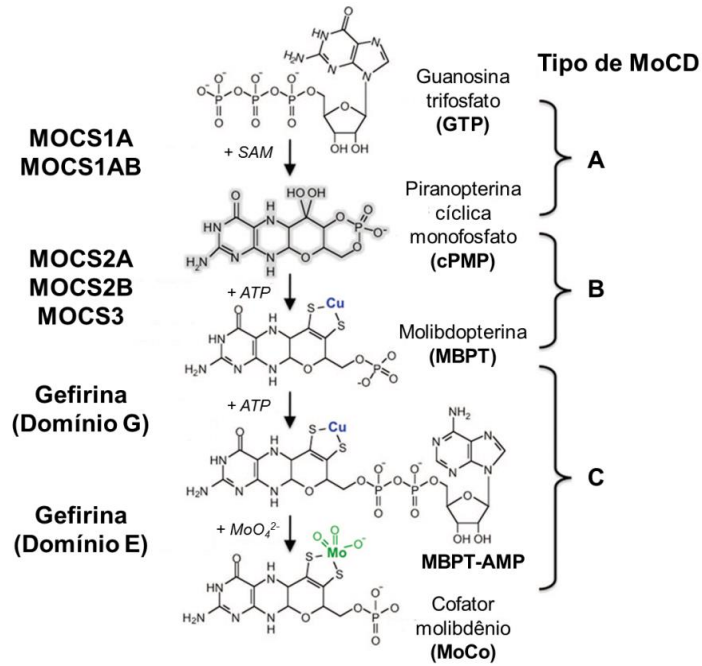


Figura 2. Via de biossíntese do cofator molibdênio (MoCo) (Adaptado de Veldman et al., 2010).

I.1.2.2 Deficiência da sulfito oxidase (SO)

A deficiência da SO é um EIM de caráter autossômico recessivo que pode ser causado por mutações no gene *SUOX*, o qual codifica a SO (deficiência isolada da SO - ISOD), ou por mutações em um dos genes que codifica alguma enzima da rota de biossíntese do MoCo (deficiência do cofator molibdênio - MoCD). Até o presente momento, foram relatadas mutações em genes de três das quatro enzimas dessa via: *MOCS1*, *MOCS2* e *GPHN*, sendo a patologia resultante da mutação de cada um desses genes classificada como MoCD do tipo A, B ou C, respectivamente (Figura 2). Além de ser necessário para a reação da SO, o MoCo também é essencial para a atividade de outras três molibdoenzimas humanas: a xantina oxidase, a aldeído oxidase e o componente redutor da amidoxima mitocondrial (mARC1 e mARC2) (Edwards

et al., 1999; Havemeyer et al., 2011; Schwarz, 2016; Tan et al., 2005). Dessa forma, os portadores da MoCD são deficientes nas atividades dessas quatro enzimas. Entretanto, já foi relatado que os sintomas neurológicos graves observados nessa forma da doença são devido à ausência da atividade da SO, uma vez que pacientes com deficiência combinada da xantina oxidase e da aldeído oxidase, ou com deficiência isolada da xantina oxidase são assintomáticos (Johnson e Duran, 2001). Até hoje, cerca de 50 pacientes com ISOD e 100 pacientes com MoCD já foram relatados na literatura. Entretanto, estima-se que a prevalência da MoCD seja em torno de 1 para cada 100.000 a 200.000 nascido vivos, uma vez que estas desordens são geralmente subdiagnosticadas (Bindu et al., 2017; Zaki et al., 2016).

O quadro clínico da ISOD e da MoCD é indistinguível (Chan et al., 2002) e inclui disfunção neurológica grave e progressiva, convulsões neonatais graves, hipotonia axial, hipertonicidade periférica, além de subluxação do cristalino e atraso no desenvolvimento, resultando geralmente em morte prematura (Edwards et al., 1999; Johnson e Duran, 2001). Bioquimicamente, os pacientes afetados por ambas as doenças apresentam acúmulo de sulfito (níveis plasmáticos normais: 5 – 10 μM ; em pacientes: 10 μM – 2 mM), tiosulfato e S-sulfocisteína (níveis plasmáticos normais: até cerca de 5 μM) em tecidos e líquidos corporais (Basheer et al., 2007; Belaidi et al., 2012; Herken et al., 2009; Ranguelova et al., 2012). Em pacientes com MoCD ainda são observados baixos níveis plasmáticos de ácido úrico e altos níveis de xantina e hipoxantina na urina, uma vez que as atividades da xantina oxidase e aldeído oxidase também estão deficientes nesses indivíduos (Chan et al., 2002; Johnson e Duran, 2001; Sass et al., 2010).

Estudos patológicos e de neuroimagem em pacientes com ISOD e MoCD evidenciam anormalidades nas substâncias branca e cinzenta, com perda massiva de neurônios, gliose, desmielinização e lesões multicísticas (Chen et al., 2014; Edwards et al., 2015; Tan et al., 2005; Vijayakumar et al., 2011). Também é observada dilatação ventricular, além de atrofia do córtex cerebral, gânglios da base, cerebelo, tálamo, tronco cerebral e corpo caloso, resultando frequentemente em microcefalia secundária (Bindu et al., 2011; Holder et al., 2014; Per et al., 2007; Tan et al., 2005). Além disso, níveis aumentados de lactato já foram observados em sangue, líquido cefalorraquidiano e diversas regiões cerebrais, incluindo os gânglios basais, em diversos pacientes (Basheer et al., 2007; Eichler et al., 2006; Holder et al., 2014; Teksam et al., 2005).

Apesar de os mecanismos responsáveis pelo aparecimento de sintomas neurológicos encontrados nos pacientes afetados pela deficiência da SO ainda não estarem totalmente estabelecidos, evidências apontam para uma ação tóxica do sulfito. Já foi demonstrado que o sulfito pode sofrer auto-oxidação e interagir com metais de transição gerando radicais livres, tais como radicais de enxofre e ânion superóxido (Abedinzadeh, 2001; Baker et al., 2002; Hayon et al., 1972; Mottley e Mason, 1988; Neta e Huie, 1985; Sadat-Shafaï et al., 1981), induzindo estresse oxidativo *in vitro* em cérebro e fígado de ratos (Chiarani et al., 2008; Derin et al., 2009; Grings et al., 2013). O sulfito também prejudica o metabolismo energético, uma vez que experimentos *in vitro* em cérebro de ratos mostram que esse metabólito inibe a creatina cinase (CK) (Grings et al., 2013), a glutamato desidrogenase (GDH) e a malato desidrogenase (MDH), além de diminuir o consumo de oxigênio e a síntese de ATP, e induzir a

abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (MPT) com consequente liberação de citocromo c para o citosol (Grings et al., 2014; Zhang et al., 2004). Por fim, em estudos com ratos deficientes para a SO foi verificado que concentrações aumentadas de sulfito induzem lipoperoxidação, diminuem a capacidade antioxidante em plasma e eritrócitos, além de causarem déficit cognitivo e morte neuronal no hipocampo (Herken et al., 2009; Kucukatay et al., 2006; Küçükatay et al., 2005). Em relação ao tiosulfato, que também se acumula na deficiência da SO, ainda não há muitos trabalhos investigando os seus efeitos. Entretanto, já foi observado que esse composto inibe a atividade da CK em diferentes estruturas cerebrais de ratos, além de aumentar a produção de espécies reativas em córtex cerebral de ratos e induzir a morte de neurônios *in vitro* (de Moura Alvorcem et al., 2017; Kumar et al., 2017; Parmeggiani et al., 2015).

O tratamento para a deficiência da SO (ISOD e MoCD) é bastante limitado, e na maioria dos casos visa principalmente o controle das convulsões graves, as quais são geralmente refratárias ao tratamento com medicamentos antiepilépticos (Johnson e Duran, 2001; Sass et al., 2010). Além disso, os pacientes recebem uma dieta com baixa quantidade de proteína e com teor reduzido de aminoácidos sulfurados. Em alguns pacientes com deficiência moderada da SO, esse tratamento diminuiu os níveis de tiosulfato e S-sulfocisteína na urina e permitiu o crescimento normal sem sinais de deterioração neurológica, além de progresso no desenvolvimento psicomotor (Touati et al., 2000). No entanto, esse tratamento não é totalmente eficaz para grande parte dos pacientes (Johnson e Duran, 2001). Um novo tratamento para pacientes com MoCD tipo A foi proposto por Veldman et al. (2010) consistindo

na administração intravenosa de piranopterina monofosfato cíclica (cPMP), um intermediário da via biossintética do MoCo (Figura 2). Os biomarcadores urinários da doença (S-sulfocisteína, xantina e urato) retornaram a níveis quase normais em todos os pacientes tratados com cPMP dentro de 2 dias, e grande parte dos pacientes apresentou uma melhora clínica, com total supressão ou redução das convulsões (Schwahn et al., 2015). Contudo, esse tratamento não é eficiente para pacientes com ISOD, que apresentam síntese normal de MoCo, e nem para pacientes com MoCD tipo B e C, uma vez que esses apresentam um bloqueio enzimático posterior à síntese de cPMP (Figura 2). Dessa forma, torna-se importante a busca por compostos protetores que possam ser utilizados para a melhora do prognóstico dos pacientes afetados por todos os fenótipos de deficiência da SO.

I.1.2.3 Proteína da encefalopatia etilmalônica 1 (ETHE1)

A enzima ETHE1 (EC 1.13.11.18), uma enxofre dioxigenase, é um homodímero de 30 kDa localizado na mitocôndria e codificado pelo gene *ETHE1* (cromossomo 19q13). É membro da família das metalo- β -lactamases, possuindo um centro metálico ao qual se liga um átomo de ferro. A função da ETHE1 foi descrita somente em 2009 por Tiranti et al., que demonstraram a sua atividade como uma dioxigenase de enxofre, estando envolvida em uma via metabólica mitocondrial responsável pela detoxificação do H₂S. Além de atuar na eliminação do H₂S proveniente do catabolismo de aminoácidos sulfurados em diversos tecidos, essa enzima, bem como a rota na qual atua, desempenha um importante papel no epitélio intestinal, uma vez que grande parte do H₂S produzido no organismo deriva do metabolismo de bactérias anaeróbicas residentes no lúmen intestinal. Nesse sentido, essa via metabólica

atua na prevenção do acúmulo local de H₂S a níveis tóxicos e do seu direcionamento ao fígado e a outros órgãos através da veia porta (Di Meo et al., 2015).

I.1.2.4 Deficiência da ETHE1

A deficiência da enzima ETHE1, também chamada de encefalopatia etilmalônica (EE), é um EIM de caráter autossômico recessivo causado por mutações no gene *ETHE1*. Esse EIM foi descrito pela primeira vez por Burlina e colaboradores (1991) em famílias italianas, e subsequentemente, foi encontrado em outras populações, principalmente em regiões mediterrâneas e da Península Arábica (Mineri et al., 2008; Tiranti et al., 2004; Tiranti et al., 2006). O gene envolvido nessa doença foi identificado somente em 2004 (Tiranti et al., 2004) e, até o presente, mais de 30 diferentes mutações já foram descritas no gene *ETHE1* (Di Rocco et al., 2006; Drousiotou et al., 2011; Mineri et al., 2008; Papetti et al., 2015; Tiranti et al., 2004; Tiranti et al., 2006; Tiranti e Zeviani, 2013; Zafeiriou et al., 2007). Essas mutações resultam na ausência da proteína devido à deleção parcial do gene, degradação de transcritos contendo códon de terminação prematuros, ou degradação de proteínas mal dobradas (Mineri et al., 2008; Tiranti et al., 2006). Em alguns casos a proteína ETHE1 está presente em pacientes com fenótipo indistinguível de pacientes que não expressam a proteína, indicando a falta de atividade da enzima nessa circunstância (Henriques et al., 2014). Mais de 80 indivíduos com características consistentes de deficiência da ETHE1 e diagnóstico molecular confirmado já foram relatados. Entretanto, a sua incidência é provavelmente bastante subestimada, já que o fenótipo bioquímico pode ser atribuído incorretamente a outras desordens metabólicas, como por exemplo defeitos na

via da flavoproteínas envolvidas na transferência de elétrons na mitocôndria (Di Meo et al., 2017; Pigeon et al., 2009; Tiranti et al., 2004).

A deficiência da ETHE1 é caracterizada por encefalopatia progressiva, retardo psicomotor, distonia, hipotonia, convulsões, microangiopatia, petéquias, acrocianose e diarreia crônica, resultando geralmente em morte precoce (Tiranti et al., 2004; Zafeiriou et al., 2007). Os achados neuropatológicos incluem atrofia cortico-fronto-temporal progressiva, anormalidades nos gânglios basais, corpo caloso e cerebelo, além de lesões cerebrais hemorrágicas e danos à substância branca (Di Meo et al., 2015; Kabil e Banerjee, 2012; Tiranti et al., 2004; Zafeiriou et al., 2007). Bioquimicamente, os pacientes apresentam acúmulo de H₂S e de tiosulfato em diversos tecidos, incluindo o cérebro, músculo esquelético e mucosa do cólon. Apesar de as concentrações cerebrais desses compostos não serem conhecidas, já foi evidenciado que os níveis plasmáticos podem chegar a cerca de 200 µM (níveis normais: < 5 µM) (Kabil e Banerjee, 2012; Tiranti et al., 2009; Viscomi et al., 2010). Além disso, os pacientes afetados apresentam níveis aumentados de ácido etilmalônico (EMA) (níveis plasmáticos em pacientes: 10-20 µM; níveis normais: < 2 µM) devido à inibição da desidrogenase das acilas-CoA de cadeia curta (SCAD) pelo H₂S (Tiranti et al., 2009; Viscomi et al., 2010). O perfil bioquímico dessa doença também inclui níveis aumentados de lactato e acilcarnitinas C4-C5 no sangue, bem como elevada excreção de ácido metilsuccínico (Grosso et al., 2004; Mineri et al., 2008; Tavasoli et al., 2017; Zafeiriou et al., 2007) .

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que alterações na bioenergética estão envolvidas no dano neurológico observado nos pacientes. Sabe-se que o H₂S é um potente inibidor do complexo IV da cadeia transportadora de elétrons (Di

Meo et al., 2011; Tiranti et al., 2009; Viscomi et al., 2010), e que a inibição crônica desse complexo leva à sua degradação (Di Meo et al., 2011). Além disso, o H₂S prejudica a homeostase energética e induz a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial *in vitro* em cérebro de ratos (Cardoso et al., 2017). Outras investigações em cérebro e músculo de ratos, fibroblastos de pacientes portadores da deficiência da ETHE1 e em camundongos *Ethe1*^{-/-} também sugerem o envolvimento de distúrbios no estado redox nessa doença (Palmfeldt et al., 2011; Ritter et al., 2015; Schuck et al., 2010; Schuck et al., 2015; Viscomi et al., 2010)

Apesar de não haver tratamento totalmente eficaz para a EE com fármacos ou tratamento dietético, algumas drogas como a riboflavina, coenzima Q10, metronidazol e N-acetilcisteína (NAC) demonstraram uma melhora clínica em alguns casos (Kilic et al., 2017; Viscomi et al., 2010; Yis et al., 2015; Zafeiriou et al., 2007). A administração concomitante de metronidazol e NAC foi um dos tratamentos que apresentou melhores resultados, já que aumentou significativamente o tempo de vida de camundongos *Ethe1*^{-/-}, além de levar à melhora clínica expressiva de cinco pacientes afetados e diminuir os níveis plasmáticos de tiosulfato, apresentando pouco efeitos adversos (Viscomi et al., 2010). Por fim, um estudo recente em um único caso de deficiência da ETHE1 demonstrou que o transplante de fígado foi eficaz no tratamento da doença (Dionisi-Vici et al., 2016). Dessa forma, embora certos tratamentos levem a uma melhora no prognóstico em alguns casos, é importante que estudos continuem sendo realizados com o intuito de desenvolver novas estratégias terapêuticas que possam trazer efeitos ainda mais eficazes ou aditivos aos tratamentos já existentes.

I.1.3 Metabolismo energético

Embora o cérebro represente apenas cerca de 2% do peso corporal, ele é um dos órgãos mais ativos metabolicamente. Em torno de 20% do oxigênio e 25% da glicose consumido pelo organismo são utilizados para a manutenção das funções cerebrais, as quais incluem processos altamente dependentes de energia, como a manutenção e restauração do gradiente de íons utilizados em processos de sinalização e a recaptação e reciclagem de neurotransmissores. Apesar disso, o cérebro apresenta baixas reservas energéticas, necessitando continuamente do fornecimento de substratos através da corrente sanguínea (Alle et al., 2009; Attwell e Laughlin, 2001; Belanger et al., 2011). Em condições normais, o metabolismo energético no cérebro é mantido principalmente pelo metabolismo oxidativo da glicose (Dickinson, 1996; Sokoloff, 1993).

Apesar de no cérebro a glicose ser praticamente toda oxidada a CO_2 e água, ela é processada de maneira distinta e metabolicamente complementar em diferentes tipos celulares, como por exemplo, astrócitos e neurônios (Clarke e Sokoloff, 1999; Magistretti e Allaman, 2015). Os astrócitos possuem alta taxa glicolítica, sendo que grande parte da glicose é convertida a lactato e direcionada para os neurônios. Nessas células, o lactato é convertido a piruvato e subseqüentemente oxidado através do ciclo do ácido cítrico (CAC) e da cadeia transportadora de elétrons (CTE), levando à produção de ATP através da fosforilação oxidativa (Belanger et al., 2011; Erecińska e Silver, 1994; Pellerin, 2005). A glicose nos neurônios é predominantemente utilizada na via das pentoses fosfato para a produção de NADPH, importante para a eliminação de espécies reativas, principalmente devido à alta atividade oxidativa mitocondrial dessas células (Bolanos et al., 2010; Magistretti e

Allaman, 2015).

I.1.3.1 Fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é o processo final do metabolismo produtor de energia nos organismos aeróbicos. Grande parte das vias de catabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos convergem para essa etapa, na qual a energia proveniente da oxidação destes substratos energéticos e conservada na forma de equivalentes reduzidos (NADH e FADH₂) é utilizada para a síntese de ATP na mitocôndria. Nesse processo, o NADH e FADH₂ doam elétrons para a CTE, sendo esses transferidos sequencialmente através de complexos enzimáticos, que em eucariotos estão ancorados na membrana mitocondrial interna. O acceptor final de elétrons é a molécula de O₂, a qual é reduzida a H₂O pela citocromo c oxidase (COX; complexo IV). A transferência de elétrons é impulsionada por um crescente potencial redox existente entre os equivalentes reduzidos, os complexos da CTE e o O₂. Uma vez que o potencial de redução de cada componente da CTE está em um nível energético menor que o anterior, há a liberação de energia à medida que os elétrons são transferidos. Essa energia é utilizada pelos complexos I, III e IV para bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. A formação desse gradiente eletroquímico (força próton-motora) é o que possibilita a fosforilação do ADP a ATP à medida que os prótons, a fim de atingir o equilíbrio eletroquímico, retornam passivamente para a matriz através de um poro associado a ATP sintase (Lieberman e Marks, 2009; Nelson e Cox, 2017).

I.1.4 Homeostase mitocondrial

Além de possuir como principal função a produção de energia na forma de ATP, a mitocôndria também é essencial para a biossíntese de esteroides e do grupamento heme, metabolismo intermediário, homeostase do cálcio e do ferro, sinalização redox, apoptose, entre outros processos (Picard et al., 2016). Dessa forma, a manutenção da homeostase mitocondrial possui um papel central no equilíbrio entre vida e morte celular, sendo regulada, parcialmente, pelos processos de fusão e fissão mitocondrial. Mitocôndrias são organelas dinâmicas que estão constantemente mudando de forma e sofrendo fusão e fissão para se adaptar a mudanças no ambiente celular, como alterações metabólicas e condições patogênicas. Esses processos auxiliam no controle do grau de conectividade e redistribuição mitocondrial, bem como no reparo de componentes danificados, ajudando a preservar mitocôndrias funcionais ou a eliminar mitocôndrias não reparáveis (Suarez-Rivero et al., 2016; van der Bliek et al., 2013; Westrate et al., 2014). Uma mitocôndria danificada pode ser resgatada através de sua fusão com uma mitocôndria saudável, o que permite a compensação dos componentes deteriorados através da troca de DNA mitocondrial, proteínas e lipídios, e da recuperação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Ni et al., 2015; Westrate et al., 2014). Por outro lado, mitocôndrias gravemente danificadas podem sofrer fissão, gerando mitocôndrias menores que são eliminadas por mitofagia (van der Bliek et al., 2013; Westrate et al., 2014).

As principais proteínas responsáveis pela fusão e fissão mitocondrial são GTPases da família da dinamina. Em mamíferos, a fusão da membrana mitocondrial externa (MME) é mediada pelas mitofusinas 1 e 2 (MFN1 e

MFN2). Essas proteínas encontram-se ancoradas à MME e iniciam a fusão das membranas de mitocôndrias vizinhas através da formação de complexos homo e hetero-oligoméricos. Já a fusão da membrana mitocondrial interna (MMI) é realizada pela proteína atrófica óptica 1 (OPA1), a qual também é importante para a manutenção da estrutura das cristas mitocondriais. A proteína relacionada à dinamina 1 (DRP1), por sua vez, é uma proteína citosólica que atua na fissão mitocondrial. Quando recrutada para a mitocôndria, a DRP1 forma hélices estendidas ao redor da superfície da organela, dividindo a MME e a MMI (Chan, 2012; Ingeman et al., 2005; Knott et al., 2008; Patten et al., 2014; van der Bliek et al., 2013).

Outro fator muito relevante para a dinâmica mitocondrial é a sua proximidade ao retículo endoplasmático (RE), formando estruturas conhecidas como membranas associadas às mitocôndrias (MAMs). As MAMs possuem um importante papel na coordenação dessas organelas, contribuindo para a transferência de lipídios e sinalização de cálcio e controlando a movimentação intracelular e a dinâmica mitocondriais (Gomez-Suaga et al., 2017; Rowland e Voeltz, 2012; van der Bliek et al., 2013). Os pontos de contato possuem proteínas que ancoram as membranas da mitocôndria e do RE, como a MFN2, além de outras proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial, como a MFN1 e a DRP1. Além disso, estudos mostram que nas MAMs túbulos do RE circunscrevem a mitocôndria diminuindo seu diâmetro e facilitando o recrutamento da DRP1 e a fissão mitocondrial (Rowland e Voeltz, 2012; Westermann, 2011). O Ca^{2+} armazenado no RE que é liberado nesses pontos de contato também tem influência sobre a fissão mitocondrial, além de estimular a produção de ATP através da ativação de enzimas do CAC e regular

a apoptose. O Ca^{2+} é liberado do RE através do receptor inositol 1,4,5-trifosfato (IP3R) e atravessa a MME da mitocôndria através do canal seletivo de ânions dependente de voltagem 1 (VDAC1), sendo essas proteínas abundantes nas MAMs e ancoradas uma a outra através da proteína de 75 kDa regulada por glicose (Grp75) (Rizzuto et al., 1993; Rizzuto et al., 1998; Szabadkai et al., 2006).

I.1.5 Radicais Livres e Defesas Antioxidantes

Radicaís livres são espécies químicas capazes de existir de forma independente contendo um ou mais elétrons desemparelhados. Sendo assim, essas espécies encontram-se em uma situação energeticamente instável, o que as torna altamente reativas (Halliwell e Gutteridge, 2015f; Southorn e Powis, 1988).

Em condições fisiológicas, o O_2 sofre redução tetravalente no complexo IV da CTE resultando na formação de H_2O . Entretanto, centros redox dos complexos da CTE, como os presentes nos complexos I e III, podem ser diretamente oxidados pelo O_2 , resultando na transferência de um único elétron para essa molécula e na consequente geração de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode ser convertido pela superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie reativa não-radical já que não apresenta elétrons desemparelhados. Por sua vez, o H_2O_2 reagindo com Fe^{2+} dá origem ao radical hidroxila (OH^{\bullet}), um radical livre extremamente reativo. O $\text{O}_2^{\bullet-}$, o H_2O_2 e o OH^{\bullet} fazem parte das chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO). Além das ERO, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), representadas principalmente pelo óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito (ONOO^-)

(Halliwell e Gutteridge, 2015f).

A produção fisiológica de ERO e ERN apresenta um importante papel na síntese e regulação de proteínas e sinalização celular, como a sinalização de insulina e adaptação ao exercício (Hamann et al., 2014; Irani, 2000; Wall et al., 2012; Ward e Peters, 1995; Webb et al., 2017), e na defesa contra infecções através da liberação de espécies reativas pelos neutrófilos (Aratani et al., 2012; Delanty e Dichter, 1998). Entretanto, quando formadas em excesso, podem causar danos às células através da oxidação de diversas biomoléculas, tais como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2015f).

Com a finalidade de evitar os efeitos nocivos das espécies reativas, as células possuem mecanismos eficientes para a detoxificação das mesmas: as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas. Essas defesas estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo) ao se ligarem aos mesmos, como as transferrinas; agentes que aprisionam espécies reativas e que são substratos de enzimas antioxidantes, como a GSH; além de proteínas que protegem biomoléculas de danos por outros mecanismos (Halliwell e Gutteridge, 2015c; Halliwell e Gutteridge, 2015e).

I.1.5.1 Estresse Oxidativo

As espécies reativas produzidas fisiologicamente são em grande parte neutralizadas pelo sistema antioxidante do organismo. No entanto, em determinadas condições patológicas há um desequilíbrio entre a produção de

espécies reativas e a sua remoção pelas defesas antioxidantes, levando à situação denominada estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2015a).

Tanto a produção aumentada de espécies reativas quanto a diminuição da capacidade antioxidante podem resultar em estresse oxidativo, tendo como possíveis consequências a lipoperoxidação e dano proteico, além de dano oxidativo ao DNA e RNA, causando mutações somáticas e distúrbios de transcrição (Delanty e Dichter, 1998; Halliwell, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2015a). As células são capazes de tolerar um nível moderado de estresse oxidativo, o que geralmente resulta em um aumento na síntese de enzimas antioxidantes com a finalidade de neutralizar as espécies reativas produzidas excessivamente. Por outro lado, se o dano celular for exacerbado, o estresse oxidativo pode levar à morte celular por necrose ou apoptose (Halliwell e Gutteridge, 2015a).

I.1.6 Compostos protetores

I.1.6.1 Bezafibrato

O bezafibrato é um fármaco da classe dos fibratos, cujos efeitos são mediados pela ativação dos receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPARs). Esses receptores são fatores de transcrição induzidos por ligante que regulam a expressão de genes envolvidos em diversos processos, incluindo homeostase lipídica, diferenciação e proliferação celular, inflamação e metabolismo energético (Corona e Duchon, 2015; Desvergne e Wahli, 1999; Wenz et al., 2008). Os PPARs são classificados em três subtipos: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , os quais apresentam características estruturais em comum, mas diferem em sua distribuição tecidual e funções fisiológicas

(Corona e Duchon, 2015; Dominy e Puigserver, 2013). Uma vez que o PPAR α e PPAR δ possuem um importante papel na modulação da oxidação de ácidos graxos, ativadores sintéticos desses receptores, tais como o pan-agonista de PPAR bezafibrato, são utilizados no tratamento de dislipidemias (Hihi et al., 2002; Kersten et al., 2000; Rudic et al., 2012; Tenenbaum et al., 2005). Embora o bezafibrato e outros fibratos estejam historicamente ligados ao tratamento dessa classe de doenças, nos últimos anos evidências têm demonstrado que, através da ativação de PPAR, esses compostos regulam outros importantes aspectos do metabolismo mitocondrial através da indução da expressão do co-ativador 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ (PGC-1 α) (Hondares et al., 2006; Hondares et al., 2007; Hondares et al., 2011; Johri et al., 2012; Komen e Thorburn, 2014). O PGC-1 α co-ativa uma série de fatores de transcrição, os quais incluem os fatores respiratórios nucleares (NRF1 e NRF2), o receptor α relacionado a estrógeno (ERR α) e os PPARs, desempenhando uma função central como o principal regulador da biogênese mitocondrial, além de possuir um papel importante na regulação de defesas antioxidantes e outros processos celulares (Fernandez-Marcos e Auwerx, 2011; Ventura-Clapier et al., 2008). Dessa forma, estudos recentes têm avaliado o uso do bezafibrato como uma potencial estratégia farmacológica em modelos animais de doenças neurodegenerativas caracterizadas por disfunção mitocondrial, tais como a doença de Huntington, taupatias e encefalomiopatia (Dumont et al., 2012; Johri et al., 2012; Noe et al., 2013), e têm observado diversos efeitos neuroprotetores exercidos por esse composto.

I.1.6.2 JP4-039

O JP4-039 faz parte de uma nova classe de sequestradores de elétrons

e ERO direcionados para a mitocôndria. A porção do JP4-039 que possui a atividade sequestradora propriamente dita é composta por um grupo nítróido, derivado do antioxidante 4-amino-TEMPO (Frantz et al., 2011; Wipf et al., 2005). Os grupos nítróido previnem a formação de espécies reativas, particularmente de ânion superóxido, devido à sua redução pela CTE à hidroxilamina, um sequestrador de espécies reativas (Frantz et al., 2011). Já a porção da molécula de JP4-039 responsável por seu acúmulo seletivo na mitocôndria (cerca de 32 vezes mais concentrado que no citosol) é derivada do antibiótico gramicidina S (Frantz et al., 2013). Publicações recentes têm demonstrado que o JP4-039 previne peroxidação lipídica e apoptose, estimula a função mitocondrial e confere proteção contra danos decorrentes da exposição à radiação (Berhane et al., 2014a; Berhane et al., 2014b; Leipnitz et al., 2018; Shinde et al., 2016).

I.2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

I.2.1 Justificativa e objetivo geral

Apesar da grave disfunção neurológica e alta taxa de mortalidade observada nas deficiências da SO (ISOD e MoCD) e da ETHE1, os mecanismos de neurotoxicidade não estão totalmente esclarecidos. Dados da literatura sugerem que a toxicidade de compostos acumulados nesses indivíduos, tais como o sulfito, tiosulfato e o sulfeto de hidrogênio, está envolvida nessas alterações. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos crônicos e agudos *in vivo* do sulfito e os efeitos agudos *in vivo* do tiosulfato sobre a homeostase mitocondrial e redox em estruturas encefálicas de ratos normais ou com deficiência da SO. Além disso,

investigamos diferentes aspectos da homeostase mitocondrial e redox, e estresse do RE em fibroblastos de pacientes com a MoCD ou deficiência da ETHE1. Por fim, considerando que ainda não existem tratamentos efetivos para todas as formas da deficiência da SO e deficiência da ETHE1, este trabalho se propôs a avaliar os efeitos protetores do bezafibrato sobre os efeitos tóxicos induzidos pelo sulfito em estriado de ratos, e do JP4-039 sobre as alterações observadas em fibroblastos de pacientes. Esperamos que um melhor entendimento sobre a fisiopatologia das anormalidades observadas nas deficiências da SO e da ETHE1 aliado à avaliação dos efeitos protetores do bezafibrato e do JP4-039 possa contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que melhorem o prognóstico dos pacientes afetados por essas doenças.

I.2.2 Objetivos específicos

Capítulo I

Avaliar os efeitos crônicos *in vivo* do sulfito em córtex cerebral, estriado, cerebelo e hipocampo de ratos deficientes para a SO sobre:

- a) Os níveis de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, glutathione redutase (GR), glutathione S-transferase (GST) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH);
- b) A atividade dos complexos II, II-III e IV da CTE, da GDH e das enzimas do CAC: citrato sintase (CS), isocitrato desidrogenase (IDH) e malato desidrogenase (MDH);
- c) A massa mitocondrial e o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Capítulo II

Avaliar os efeitos agudos *in vivo* da administração intraestriatal de sulfito, bem como os efeitos neuroprotetores do bezafibrato em estriado de ratos sobre:

- a) A atividade da CK, dos complexos I-III, II, II-III e IV da CTE, da GDH e das enzimas do CAC: CS, IDH, succinato desidrogenase (SDH) e MDH;
- b) A massa mitocondrial, o $\Delta\Psi_m$ e o imunoconteúdo de PGC-1 α nuclear, da isoforma 1 da COX IV e de LC3B;
- c) Os níveis de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes GPx, GR, GST, G6PDH, CAT e SOD;
- d) A marcação de proteína fibrilar glial ácida (GFAP), proteína B de ligação ao cálcio S100 (S100B), proteína nuclear específica de neurônios (NeuN) e Fluoro-Jade C[®].

Capítulo III

Avaliar os efeitos *in vivo* da administração intraestriatal de tiosulfato em estriado de ratos sobre:

- a) A atividade da CK, dos complexos II, II-III e IV da CTE, da GDH e das enzimas do CAC: CS, IDH, SDH e MDH;
- b) Os níveis de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes GPx, GR, GST, G6PDH, CAT e SOD;
- c) A marcação de NeuN, GFAP e S100B.

Ainda foram avaliados os efeitos do ditiotreitol (DTT), alopurinol (ALP), apocinina (APO) e dos antioxidantes GSH, melatonina (MEL), trolox (TRO) e ácido lipoico (AL) sobre a diminuição da atividade da CK induzida por tiosulfato *in vitro* em estriado de ratos.

Capítulo IV

Avaliar parâmetros de metabolismo energético, dinâmica mitocondrial, estresse oxidativo e estresse do RE em fibroblastos de pacientes com MoCD ou deficiência da ETHE1, tais como:

- a) A produção de ânion superóxido, respiração basal e respiração máxima mitocondrial e a produção de ATP;
- b) Imunoconteúdo das proteínas envolvidas na fusão mitocondrial: MFN1, MFN2 e OPA1; e na fissão mitocondrial: DRP1;
- c) Imunoconteúdo de proteínas das MAMs: IP3R, VDAC1, Grp75; e de proteínas marcadoras de estresse do RE: DDIT3 e Grp78;
- d) Morte celular por apoptose e necrose.

Ainda foram avaliados os efeitos do antioxidante mitocondrial JP4-039 sobre as alterações observadas em fibroblastos de pacientes com MoCD ou deficiência da ETHE1.

PARTE II

Artigos científicos

Capítulo I

Higher susceptibility of cerebral cortex and striatum to sulfite neurotoxicity in sulfite oxidase-deficient rats

Mateus Grings, Alana Pimentel Moura, Belisa Parmeggiani, Marcela Moreira Motta, Rafael Mello Boldrini, Pauline Maciel August, Cristiane Matté, Angela Terezinha de Souza Wyse, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz

Artigo científico publicado no periódico Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1862: 2063-2074, 2016

Capítulo II

Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, antioxidant system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency

Mateus Grings, Alana Pimentel Moura, Belisa Parmeggiani, Julia Tauna Pletsch, Gabriela Miranda Fernandez Cardoso, Pauline Maciel August, Cristiane Matté, Angela T.S. Wyse, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz

Artigo científico publicado no periódico Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -
Molecular Basis of Disease 1863(9):2135-2148, 2017

Capítulo III

Evidence that thiosulfate inhibits creatine kinase activity in rat striatum via thiol group oxidation

Mateus Grings, Belisa Parmeggiani, Alana Pimentel Moura, Leonardo de Moura
Alvorcem, Angela TS Wyse, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz

Artigo científico submetido para publicação no periódico Neurotoxicity Research

Capítulo IV

Disruption of mitochondrial bioenergetics and dynamics, redox homeostasis and endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in fibroblasts from patients with sulfite oxidase and ETHE1 deficiencies: rescue by the mitochondrial-targeted antioxidant JP4-

039

Mateus Grings, Bianca Seminotti, Anuradha Karunanidhi, Lina Ghaloul-Gonzalez, Al-Walid Mohsen, Peter Wipf, Johan Palmfeldt, Jerry Vockley,
Guilhian Leipnitz

Artigo científico em processo de submissão para o periódico Journal of
Biological Chemistry

PARTE III

Discussão e Conclusões

III.1. DISCUSSÃO

Indivíduos afetados pela deficiência da SO (ISOD e MoCD) apresentam convulsões neonatais graves e encefalopatia progressiva. Os achados neuropatológicos geralmente incluem comprometimento da substância branca e cinzenta em todo o cérebro e atrofia de diversas regiões encefálicas, incluindo córtex cerebral e gânglios basais (Schwahn et al., 2015; Vijayakumar et al., 2011). Apesar de os pacientes portadores da deficiência da SO apresentarem neuropatologia grave, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos não estão totalmente esclarecidos. Por outro lado, nos últimos 15 anos estudos de diferentes grupos têm sugerido que o sulfito é tóxico para o sistema nervoso central (SNC) (Chiarani et al., 2008; Grings et al., 2013; Grings et al., 2014; Grings et al., 2016; Kocamaz et al., 2012; Parmeggiani et al., 2015; Zhang et al., 2004).

Dessa forma, visando melhor compreender os sintomas neurológicos observados na deficiência da SO e verificar o potencial efeito tóxico de uma exposição crônica ao sulfito em diferentes regiões encefálicas, avaliamos no primeiro capítulo desta tese os efeitos *in vivo* do sulfito sobre as defesas antioxidantes e a bioenergética no córtex cerebral, estriado, cerebelo e hipocampo de ratos com atividade normal ou deficiente da SO.

Para tanto, ratos de 21 dias de idade receberam tungstênio (na forma de tungstato de sódio), um competidor do molibdênio, através da água de beber com o intuito de induzir a deficiência da SO. Após esse tratamento, observamos uma diminuição acentuada na atividade da SO (72%) no fígado desses animais, indicando a eficácia na indução da deficiência da SO. Essa magnitude de inibição dessa atividade enzimática está de acordo com os

achados de Yoshida et al. (2015) quando aplicadas as mesmas condições do presente estudo. Além da administração de tungstênio, os animais também receberam metabissulfito de sódio a fim de mimetizar o acúmulo de sulfito e seus derivados observado na doença (Chan et al., 2002; Johnson e Duran, 2001; Ranguelova et al., 2012). É importante ressaltar aqui que o metabissulfito de sódio reage com água dando origem ao sulfito (Gunnison, 1981; Yu et al., 2012), e que estudos anteriores utilizando um modelo animal similar ao deste trabalho demonstraram que esse composto é eficientemente absorvido na dose administrada, aumentando a concentração plasmática de S-sulfonato, um indicador de ingestão de sulfito comumente utilizado (Gunnison e Palmes, 1973; Gunnison e Jacobsen, 1987; Ozturk et al., 2011). Em conformidade com isso, observamos concentrações urinárias de sulfito aumentadas em animais deficientes para a SO que receberam metabissulfito. Por outro lado, animais que receberam apenas metabissulfito não apresentaram acúmulo de sulfito. Isso pode ser explicado pela alta atividade de SO em fígado de ratos (Johnson et al., 1974), de forma que essa enzima mantém os níveis de sulfito baixos. Similarmente, os animais tratados apenas com tungstênio não apresentaram acúmulo de sulfito, possivelmente porque a dose de tungstênio utilizada não foi capaz de abolir completamente a atividade da SO. Estes achados sugerem que em nossas condições experimentais apenas a administração concomitante de metabissulfito e tungstato leva ao acúmulo de sulfito.

No passo seguinte, avaliamos parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral, estriado, cerebelo e hipocampo de animais com atividade normal e deficiente da SO. Deve ser enfatizado que essas regiões encefálicas encontram-se comprometidas em pacientes com deficiência da SO (Johnson e

Duran, 2001; Tan et al., 2005; Vijayakumar et al., 2011). Inicialmente, verificamos a diminuição das concentrações de GSH em córtex cerebral, mas não em estriado, cerebelo e hipocampo de ratos deficientes para a SO tratados com sulfito em relação ao grupo controle. Esse antioxidante é o tiol não-proteico mais abundante nas células e a principal defesa antioxidante não-enzimática no cérebro, uma vez que age como sequestrador de espécies reativas e serve de substrato para outras enzimas antioxidantes, tais como a GPx e a GST (Deponte, 2013; Halliwell e Gutteridge, 2015b; Lu, 2013; Schafer e Buettner, 2001). Tais resultados, aliados a achados anteriores, indicam que as defesas antioxidantes não-enzimáticas são alteradas pelo sulfito em córtex cerebral de ratos com atividade deficiente da SO provavelmente devido ao aumento da produção de espécies reativas induzido por esse metabólito (Grings et al., 2013; Hayon et al., 1972; Mottley e Mason, 1988; Neta e Huie, 1985).

Com a finalidade de seguir investigando os efeitos do sulfito sobre o sistema de defesa antioxidante, avaliamos a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GR, G6PDH e GST. Verificamos que o sulfito diminuiu a atividade da GST e da GR em córtex cerebral, e da GST em cerebelo de ratos deficientes para a SO. A diminuição da atividade da GST pode ter sido mediada pela glutathione S-sulfonate, um composto formado através da lise de GSSG pelo sulfito e já reportado como um inibidor competitivo dessa enzima em fígado e pulmões de ratos (Keller e Menzel, 1989; Leung et al., 1985). Além disso, a redução da atividade da GST e da GR pode ter sido causada pelo ataque de espécies reativas geradas pelo sulfito a aminoácidos críticos da estrutura dessas enzimas, uma vez que já foi

observado que elas podem ser inativadas por oxidação (Murakami et al., 2014; Ricci et al., 1991; Shen et al., 1993; Singh et al., 2004). Considerando que a GR desempenha um papel muito importante na redução do GSSG a GSH e na manutenção de um ambiente intracelular redutor (Aoyama e Nakaki, 2015; Deponte, 2013; Espinosa-Diez et al., 2015), pode-se presumir que a inibição dessa enzima em córtex cerebral contribui fortemente para a depleção de GSH observada nesse tecido. Em relação à GST, essa enzima usa GSH como substrato a fim de eliminar potenciais eletrófilos pró-oxidantes, os quais incluem produtos de dano oxidativo, tais como peróxidos orgânicos (Ahmed et al., 2016; Deponte, 2013; Espinosa-Diez et al., 2015). Portanto, a concentração de GSH diminuída juntamente com uma redução da atividade da GST pode levar ao acúmulo de moléculas oxidadas e assim agravar o quadro de estresse oxidativo. Nesse contexto, Kuçukatay et al. (2006) demonstrou que o sulfito induz peroxidação lipídica em cérebro de ratos com deficiência da SO. As atividades da CAT, SOD e G6PDH não foram alteradas em nenhum dos grupos, corroborando achados da literatura (Ozsoy et al., 2014).

A administração de sulfito também alterou as atividades dos complexos da CTE, diminuindo a atividade do complexo IV e aumentando as atividades dos complexos II e II-III em estriado de ratos deficientes para a SO. O sulfito também aumentou a atividade do complexo II no hipocampo desses animais. Sabe-se que o complexo IV possui um papel fundamental como o sítio de regulação central da transferência de elétrons, bombeamento de prótons e síntese de ATP (Arnold, 2012). Dessa forma, é possível que a diminuição da atividade do complexo IV induzida por sulfito no estriado possa levar a um prejuízo no $\Delta\Psi_m$ e conseqüentemente à diminuição dos níveis de ATP, como

observado em outros estudos (Grings et al., 2013; Grings et al., 2014; Vincent et al., 2004). Já o aumento da atividade dos complexos II e II-III visto no estriado pode ser um mecanismo compensatório em resposta à atividade reduzida do complexo IV (Rhein et al., 2009; Sauer et al., 2009). Entretanto, deve ser considerado que outros efeitos deletérios do sulfito sobre a função mitocondrial no estriado e no hipocampo também possam ter contribuído para o aumento da atividade dos complexos da cadeia respiratória (Grings et al., 2014; Zhang et al., 2004).

Considerando que o sulfito alterou o fluxo de elétrons pela CTE no estriado e induziu um desequilíbrio na homeostase redox em córtex cerebral, foram avaliados os efeitos desse metabólito sobre a massa mitocondrial e o $\Delta\Psi_m$ nesses tecidos. Nenhuma alteração foi verificada sobre a massa mitocondrial. Por outro lado, o sulfito dissipou o $\Delta\Psi$ em ambas as estruturas cerebrais em ratos com atividade deficiente da SO. A redução do $\Delta\Psi_m$ no estriado está de acordo com os nossos dados que mostram uma inibição da atividade do complexo IV nessa região. Esse resultado também reforça a hipótese de que a atividade aumentada dos complexos II e II-III no estriado pode ter ocorrido numa tentativa de reestabelecer o $\Delta\Psi_m$. Nesse aspecto, dados anteriores observados *in vitro* em nosso grupo de pesquisa demonstraram que o sulfito dissipa o $\Delta\Psi_m$ de membrana na presença de cálcio e causa inchamento mitocondrial devido à indução da abertura do poro de MPT em cérebro de ratos (Grings et al., 2014). Em relação ao córtex cerebral, ainda avaliamos a atividade de enzimas importantes do CAC e da GDH, já que o sulfito induziu estresse oxidativo e a redução do $\Delta\Psi_m$, mas não prejudicou a função da CTE nessa região. Foi visto que o sulfito diminuiu a atividade da

MDH e da GDH em mitocôndrias de córtex cerebral de ratos com atividade normal e deficiente da SO, sugerindo que a redução do $\Delta\Psi_m$ nesse tecido possa ser uma consequência da inibição da atividade da MDH e da GDH. Esses dados estão de acordo com o fato de que o sulfito inibe a atividade da MDH e da GDH e diminui o consumo de oxigênio em mitocôndrias de cérebro de ratos *in vitro* (Grings et al., 2014; Zhang et al., 2004). Além disso, pode ser sugerido que a inibição da atividade dessas enzimas ocorreu possivelmente por um dano oxidativo, como anteriormente demonstrado (Grings et al., 2014).

Levando em consideração a resposta de cada tecido frente aos efeitos deletérios do sulfito, percebe-se que o córtex cerebral foi a região mais suscetível a um desequilíbrio da homeostase redox induzida por esse composto. Isto poderia ser explicado pelo fato de o córtex cerebral possuir baixa atividade de enzimas antioxidantes, comparado a outras estruturas cerebrais (Brannan et al., 1980; Halliwell e Gutteridge, 2015d). Também observamos que componentes celulares responsáveis pelo metabolismo energético tanto do córtex cerebral quanto do estriado são bastante suscetíveis à toxicidade do sulfito. A vulnerabilidade do córtex cerebral pode ocorrer devido à maior concentração de espécies reativas geradas pelo sulfito nessa região, possivelmente danificando enzimas do CAC. Já a suscetibilidade do estriado pode estar relacionada a diversos aspectos, incluindo a baixa quantidade de SDH, alta concentração de ciclofilina D, que favorece a indução da abertura do poro de MPT, além de grande quantidade de “*inputs*” glutamatérgicos recebidos do córtex (Albin e Greenamyre, 1992; Brustovetsky et al., 2003; Dubinsky, 2009; Friberg et al., 1999; Nishino et al., 2000).

Diferentemente do córtex cerebral e do estriado, encontramos apenas

efeitos moderados do sulfito em cerebelo e hipocampo. Os dados observados em cerebelo poderiam ser explicados pelo fato dessa região apresentar uma das menores expressões de SO dentre as estruturas encefálicas (Woo et al., 2003), sugerindo que o cerebelo apresenta baixas concentrações de sulfito e portanto um metabolismo reduzido desse metabólito. O cerebelo também possui um baixo consumo basal de oxigênio quando comparado a outras estruturas encefálicas, resultando possivelmente em menores níveis de espécies reativas (Sauerbeck et al., 2011). Quanto ao hipocampo, não sabemos as razões pelas quais essa região é menos vulnerável ao sulfito. Entretanto, diversos estudos observaram que o hipocampo é menos suscetível a dano do que outras regiões cerebrais quando exposto a certos compostos tóxicos (Bertoldi et al., 2012; Schmitz et al., 2012).

Nossos dados mostram que o córtex cerebral e o estriado são mais vulneráveis à toxicidade induzida pelo sulfito em relação ao cerebelo e ao hipocampo, indicando que há uma seletividade regional para os efeitos desse metabólito em ratos deficientes para a SO. Deve ser enfatizado que o córtex cerebral apresenta a maior expressão de SO dentre as estruturas encefálicas humanas e que o putâmen e o núcleo caudado, regiões do estriado, também apresentam alta expressão de SO (Woo et al., 2003). Pode ser sugerido, portanto, que o córtex cerebral e o estriado necessitam de níveis mais altos de SO devido à maior suscetibilidade ao sulfito ou maior produção desse composto nessas regiões (Woo et al., 2003). Essa hipótese está de acordo com dados clínicos mostrando que essas estruturas cerebrais estão gravemente comprometidas em pacientes portadores da deficiência da SO (Eyaid et al., 2005; Higuchi et al., 2014; Hobson et al., 2005; Hoffmann et al.,

2007; Rupar et al., 1996; Stence et al., 2013).

O segundo e o terceiro capítulos da nossa investigação tiveram como foco avaliar se a administração intraestriatal de sulfito e tiosulfato, respectivamente, poderia afetar a homeostase mitocondrial e as defesas antioxidantes, e induzir dano celular, com o intuito de progredir na elucidação da fisiopatologia do dano neurológico observado nas deficiências da SO e da ETHE1. Ressalte-se aqui que a deficiência da ETHE1 é uma doença neurológica grave e, similarmente à deficiência da SO, caracterizada por anormalidades nos gânglios basais e acúmulo de tiosulfato. Além disso, visto que ainda não há um tratamento efetivo para todas as formas da deficiência da SO, estudamos no capítulo dois o potencial efeito neuroprotetor do pan-agonista do receptor PPAR bezafibrato sobre os efeitos tóxicos do sulfito.

A administração de sulfito diminuiu a massa mitocondrial em estriado, o que pode ter ocorrido devido a danos à mitocôndria causados pela geração aumentada de ERO e pela indução de MPT por esse metabólito, como demonstrado em outros estudos do nosso grupo (Grings et al., 2013; Grings et al., 2014). Em concordância com a diminuição da massa mitocondrial, o sulfito também diminuiu o conteúdo da isoforma 1 da COX IV. Como mencionado anteriormente, as mitocôndrias de estriado são mais suscetíveis a insultos quando comparadas a mitocôndrias de outras estruturas cerebrais (Brustovetsky et al., 2003; Dubinsky, 2009). Por outro lado, o sulfito não alterou a marcação com laranja de acridina e os níveis de LC3B, sugerindo que não há a indução de autofagia por esse metabólito. Dessa forma, é possível que as mitocôndrias danificadas pelo sulfito sejam eliminadas por um mecanismo ainda não identificado com a finalidade de preservar apenas mitocôndrias

funcionais, ou seja, hiperpolarizadas, e que apresentam baixa produção de ERO, refletindo assim em redução da massa mitocondrial. Nesse contexto, sabe-se que tanto elevados níveis de ERO quanto a MPT podem induzir a eliminação de mitocôndrias danificadas (Ding e Yin, 2012; Held e Houtkooper, 2015; Lemasters et al., 2002; Ni et al., 2015; Scherz-Shouval e Elazar, 2011). A diminuição da massa mitocondrial foi prevenida pelo tratamento com bezafibrato, possivelmente devido à indução da biogênese dessa organela através da ativação e aumento de expressão de PGC-1 α , o que foi confirmado pela observação de que o bezafibrato previne a diminuição dos níveis de PGC-1 α no núcleo causada por sulfito. A redução dos níveis de PGC-1 α observada após a administração de sulfito pode afetar a expressão de diversos genes do eixo PPAR-PGC-1 α , tais como Tfam, NRF1 e NRF2. A expressão desses fatores de transcrição é geralmente induzida em resposta a condições adversas, tais como aumento de ERO e dano celular, uma vez que eles estão envolvidos na replicação, manutenção e transcrição do DNA mitocondrial, bem como na expressão de enzimas antioxidantes, subunidades da cadeia respiratória e de outras proteínas importantes para a função mitocondrial (Dubinsky, 2009; Finck e Kelly, 2006; St-Pierre et al., 2006). Sendo assim, a redução do conteúdo de PGC-1 α pode levar a um prejuízo no recrutamento de mecanismos de proteção e de reparo, de forma que a capacidade da célula de lidar com os efeitos tóxicos do sulfito possa ser prejudicada. É interessante ressaltar aqui que estudos em camundongos nocautes para o PGC-1 α mostram que a perda desse componente é suficiente para induzir manifestações fisiopatológicas observadas em doenças neurodegenerativas (Lin et al., 2004) e que níveis reduzidos de PGC-1 α já foram evidenciados nas

doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntigton, e na ataxia de Friedreich (Marmolino et al., 2010; Sweeney e Song, 2016; Weydt et al., 2006; Zheng et al., 2010).

O sulfito também diminuiu a atividade da CS e do complexo I-III da CTE em estriado de ratos, enquanto que o tiosulfato reduziu a atividade da CS sem alterar a atividade dos complexos da CTE. Uma vez que a CS é a enzima passo-limitante do CAC, é possível que a sua inibição por esses compostos leve a um fluxo reduzido de metabólitos no CAC e, conseqüentemente, a um prejuízo na produção de energia. Além disso, considerando que a CS é usualmente utilizada como marcador da densidade mitocondrial, essa alteração está de acordo com a diminuição da massa mitocondrial causada pelo sulfito. A redução da atividade da CS induzida por sulfito foi atenuada pelo bezafibrato, possivelmente devido à indução de biogênese mitocondrial. No entanto, como essa inibição não foi totalmente prevenida pelo bezafibrato, pode-se presumir que diferentes mecanismos, além da diminuição da massa mitocondrial, possam estar envolvidos nessas alterações, como um efeito direto do sulfito sobre grupamentos sulfidril de resíduos de aminoácidos dessa enzima (Grings et al., 2014; Johnson e Duran, 2001).

Outra enzima que apresentou atividade reduzida em animais tratados com sulfito e tiosulfato foi a CK. Essa enzima apresenta um importante papel no transporte e tamponamento energético, principalmente em tecidos com alta demanda energética como o cérebro, de forma que os efeitos tóxicos do sulfito e do tiosulfato podem comprometer esses processos no estriado. Tais resultados estão de acordo com estudos *in vitro* do nosso grupo, os quais evidenciaram que o sulfito e o tiosulfato inibem acentuadamente a atividade

da CK em córtex cerebral (Grings et al., 2013), estriado e hipocampo (de Moura Alvorcem et al. 2017), indicando que a inibição dessa enzima é um efeito tóxico relevante induzido por esses compostos. Além disso, deve ser considerado que a CK possui resíduos de aminoácidos bastante vulneráveis, como a cisteína 282 do sítio ativo da enzima, que é muito reativa frente a oxidantes (Li et al., 2011; Wang et al., 2001; Wendt et al., 2003). Nesse particular, verificamos que o bezafibrato preveniu totalmente a inibição dessa enzima causada pelo sulfito, o que possivelmente ocorreu pelo aumento das defesas antioxidantes induzidas pelo bezafibrato, como observado neste e em estudos anteriores (St-Pierre et al., 2006).

Ainda, tendo em vista essa suscetibilidade da CK frente a oxidantes e considerando que o principal efeito tóxico do tiosulfato observado em estriado foi a inibição da CK, no capítulo três desta tese também avaliamos o efeito *in vitro* de uma série de moléculas com potencial antioxidante e redutor sobre a atividade dessa enzima na presença de tiosulfato com a finalidade de melhor compreender a inibição causada por esse metabólito. Observamos que o DTT, um composto utilizado para a redução de pontes dissulfeto de proteínas em sistema biológicos (Chang, 1997), preveniu a redução da atividade da CK induzida por tiosulfato, sugerindo que o tiosulfato altera grupamentos sulfidríla de resíduos de aminoácidos presentes na estrutura da CK. Os antioxidantes GSH, MEL e AL também preveniram, enquanto que o TRO atenuou a diminuição da atividade da CK, indicando a participação de espécies reativas na inibição da enzima pelo tiosulfato. Levando em consideração os resultados encontrados com o uso desses compostos e o fato de o GSH ser um clássico protetor contra processos de oxidação de grupamentos sulfidríla

(Halliwell e Gutteridge, 2007), presume-se que a exposição ao tiosulfato leva à oxidação de grupamentos tióis fundamentais para a atividade da enzima. Também pode-se sugerir o envolvimento do radical hidroxila na inibição da atividade da CK pelo tiosulfato, uma vez que a MEL e o AL são eficientes sequestradores desse radical (Brizzolari et al., 2017; Galano, 2011; Halliwell e Gutteridge, 2007; Tamura et al., 2013). Por outro lado, nossos achados sugerem que não há o envolvimento de superóxido produzido pela xantina oxidase e pela NADPH oxidase, já que os inibidores dessas enzimas ALP e APO, respectivamente, não alteraram a inibição da CK induzida por tiosulfato.

A seguir, estudamos os efeitos da administração intraestriatal de sulfito e tiosulfato sobre as defesas antioxidantes. Os níveis de GSH foram diminuídos pelo sulfito, um efeito que reflete o aumento da produção de espécies reativas induzido por esse composto (Grings et al., 2013; Mottley e Mason, 1988; Neta e Huie, 1985). Também vimos que o sulfito diminuiu a atividade da GPx, GR, GST e G6PDH, e aumentou a atividade da CAT. A redução da atividade da GPx, GR, GST e G6PDH induzida pelo sulfito pode comprometer de maneira significativa o metabolismo do GSH. Nesse contexto, a detoxificação de peróxidos pode ser afetada, já que a GPx apresenta um importante papel na eliminação do peróxido de hidrogênio e de peróxidos orgânicos, e a GST participa da excreção de produtos danificados por oxidação, como peróxidos orgânicos (Deponte, 2013). No que se refere à GR, a redução de sua atividade pode ter contribuído para a diminuição dos níveis de GSH, já que essa enzima é essencial na redução do GSSG a GSH, e conseqüentemente para a manutenção de um meio intracelular reduzido (Couto et al., 2016; Espinosa-Diez et al., 2015). A atividade da GR pode estar ainda mais comprometida pela

diminuição na produção de seu substrato NADPH causada pela inibição da G6PDH. Já o aumento da atividade da CAT pode ter acontecido devido à indução da expressão dessa enzima como um mecanismo compensatório, na tentativa de eliminar o peróxido de hidrogênio (Ingles et al., 2016). Em relação ao tiosulfato, o único efeito observado sobre os parâmetros de estresse oxidativo avaliados foi o aumento da atividade da CAT, o que possivelmente impede o acúmulo de peróxido de hidrogênio, similarmente ao que foi observado para o sulfito.

Quanto ao tratamento com bezafibrato sobre a atividade das enzimas antioxidantes alteradas pelo sulfito, verificamos que esse composto preveniu a diminuição da atividade da GPx, GR, GST e G6PDH. Nesse sentido, sabe-se que a ativação do eixo PPAR-PGC-1 α induz o aumento da expressão de enzimas antioxidantes (St-Pierre et al., 2006) de forma que o sistema antioxidante da célula pode ser reforçado pelo bezafibrato para lidar melhor com a produção aumentada de espécies reativas e proteger as macromoléculas frente ao dano oxidativo.

Pacientes com deficiência da SO apresentam gliose difusa e perda neuronal massiva em diferentes estruturas cerebrais, incluindo os gânglios basais (Edwards et al., 2015; Hobson et al., 2005; Rupa et al., 1996; Veldman et al., 2010). Sendo assim, examinamos se os efeitos tóxicos induzidos pelo sulfito e pelo tiosulfato poderiam estar envolvidos nessas anormalidades. O sulfito aumentou a marcação de GFAP e S100B em estriado, indicando reatividade glial, uma condição desencadeada por dano ao SNC e caracterizada pela ativação e hipertrofia de astrócitos, aumento da expressão de GFAP e S100B, e, em casos graves, proliferação dessas células (Anderson

et al., 2014; Sofroniew e Vinters, 2010). Essas alterações que ocorrem nos astrócitos têm o potencial de proteger os neurônios circundantes, mas em casos extremos os astrócitos podem perder funções essenciais ou produzir moléculas potencialmente tóxicas, induzindo ou exacerbando o dano neuronal, como observado em diversas doenças neurodegenerativas (De Keyser et al., 2008; McGeer e McGeer, 2008; Nagele et al., 2004; Olivera-Bravo et al., 2011). Em consonância com isso, verificamos que o sulfito diminuiu a marcação de NeuN e aumentou a marcação de Fluoro-Jade[®] C, indicando perda neuronal. Nesse sentido, Lin et al. (2004) observaram lesões espongiiformes decorrentes de degeneração neuronal associada com astrogliose no estriado de camundongos nocaute para PGC-1 α . Desse modo, os resultados do presente estudo, aliados a estudos anteriores, sugerem que diferentes mecanismos podem estar envolvidos na perda neuronal induzida pelo sulfito, tais como um prejuízo no eixo PPAR-PGC-1 α , a abertura do poro de MPT com consequente liberação de citocromo c e possível indução de apoptose, bem como a reatividade glial (Grings et al., 2014; Kim et al., 2003; Rasola e Bernardi, 2011). Na tentativa de prevenir o dano neuronal e a reatividade glial causados pelo sulfito, realizamos um tratamento com bezafibrato antes ou após a administração de sulfito. Verificamos que ambos os tratamentos preveniram a astrogliose e a perda de neurônios induzidas por esse metabólito, demonstrando um significativo efeito protetor por parte do bezafibrato. Nossos resultados estão de acordo com o estudo de St-Pierre et al. (2006) mostrando que células estriatais de animais selvagens expressando PGC-1 α ectopicamente foram protegidas de morte induzida por peróxido de hidrogênio. Além disso, já foi verificado que o bezafibrato evita dano neuronal e reatividade

glial através do aumento da biogênese mitocondrial e diminuição do dano oxidativo em modelos animais de doença de Huntington (Johri et al., 2012) e encefalopatia mitocondrial (Noe et al., 2013).

A administração de tiosulfato, por outro lado, não alterou a marcação de NeuN, GFAP e S100B em estriado de ratos, o que sugere que esse composto não provoca dano a neurônios e astrócitos em nossas condições experimentais. Entretanto, deve ser ressaltado que esses resultados foram obtidos utilizando apenas uma única injeção aguda de tiosulfato com o objetivo de mimetizar um evento catabólico caracterizado pelo acúmulo de metabólitos (Johnson e Duran, 2001). Considerando que pacientes com ISOD, MoCD e deficiência da ETHE1 podem apresentar níveis cronicamente elevados dos metabólitos em questão (Johnson e Duran, 2001), é possível que concentrações aumentadas de tiosulfato por maiores períodos possam exercer uma toxicidade ainda mais pronunciada no cérebro. Além disso, é importante enfatizar que outros mecanismos fisiopatológicos estão envolvidos no dano neurológico observado nos pacientes com deficiência da SO, do MoCo e da ETHE1 (Cardoso et al., 2017; Chiarani et al., 2008; de Moura Alvorcem et al., 2017; Di Meo et al., 2011; Di Meo et al., 2015; Grings et al., 2014; Grings et al., 2016; Grings et al., 2017; Parmeggiani et al., 2015; Zhang et al., 2004). Dessa forma a toxicidade exercida pelo tiosulfato poderia atuar em sinergismo com esses mecanismos, como os efeitos do sulfito, por exemplo, resultando em um dano celular mais pronunciado e contribuindo para o surgimento e a progressão dos sintomas dessas doenças.

Analisando os resultados do primeiro e do segundo capítulos, podemos observar que há diferenças nos efeitos tóxicos do sulfito no estriado quando

esse metabólito foi administrado através da água de beber em ratos deficientes para a SO por 6 semanas ou quando o metabólito foi administrado por injeção intraestriatal. Essas diferenças poderiam ser explicadas por uma série de fatores, incluindo: o tempo de exposição ao sulfito; a concentração de sulfito atingida no estriado; a via de administração; e a idade dos animais ao final do tratamento. Acreditamos que os efeitos moderados exercidos pelo sulfito no capítulo um poderiam ser decorrentes de uma adaptação do organismo aos níveis aumentados de sulfito que estão ocorrendo por um período relativamente longo. Em contraste, no capítulo dois, a exposição aguda ao sulfito, principalmente em um período curto (30 min), não permitiria essa adaptação. Os efeitos moderados também poderiam estar relacionados a uma menor concentração de sulfito atingida no estriado, já que esse metabólito foi administrado oralmente. Por outro lado, no segundo modelo, o sulfito foi administrado diretamente no estriado, o que provavelmente levou a maiores concentrações desse metabólito nessa região.

No que se refere à comparação dos efeitos causados pela administração intraestriatal de sulfito e tiosulfato, também observamos diferenças expressivas. Apesar de ambos os compostos terem sido administrados pela mesma via e na mesma concentração, o sulfito apresentou maior toxicidade. Esses resultados estão de acordo com estudos *in vitro* realizados pelo nosso grupo em cérebro de ratos (Grings, 2014 e Grings, 2014, Bel), os quais demonstraram um maior prejuízo na bioenergética mitocondrial e na homeostase redox por parte do sulfito. Além disso, um estudo recente também evidenciou que o sulfito é mais tóxico para neurônios corticais, apresentando um valor de LD₅₀ muito menor do que o do tiosulfato (Kumar 2017).

Entretanto, é importante enfatizar que ambos os metabólitos se encontram acumulados na ISOD e na MoCD, assim como a S-sulfocisteína, que também apresenta efeitos tóxicos, destacando-se principalmente a indução de excitotoxicidade devido à sua similaridade estrutural com o glutamato (Kumar, 2017). Sendo assim, presume-se que esses compostos apresentem efeitos sinérgicos, possivelmente levando a danos celulares ainda mais proeminentes nos pacientes. O mesmo pode ser sugerido no caso de pacientes com deficiência da ETHE1, os quais, além de apresentarem acúmulo de tiosulfato, possuem níveis aumentados de H₂S e EMA, compostos que também exercem toxicidade (Amaral et al., 2012; Cardoso et al., 2017; Cecatto et al., 2014; Di Meo et al., 2011; Leipnitz et al., 2003). Por fim, também deve-se destacar que esses compostos se encontram acumulados cronicamente em pacientes, de forma que é provável que concentrações aumentadas de sulfito e de tiosulfato por longos períodos apresentem neurotoxicidade ainda mais acentuada, sendo de grande relevância para a fisiopatologia dos danos neurológicos observados na ISOD, MoCD e deficiência da ETHE1.

No quarto capítulo da tese objetivamos dar continuidade à investigação dos mecanismos patológicos observados na deficiência da ETHE1 e da SO através da avaliação da bioenergética e dinâmica mitocondriais, comunicação entre o RE e a mitocôndria, produção de ERO, estresse do RE e apoptose em fibroblastos de pacientes. Para isso, foram utilizados fibroblastos de quatro pacientes com a deficiência da ETHE1 e de um paciente com deficiência da SO. Além disso, conforme mencionado anteriormente, considerando que ainda não há tratamento para todas as formas de deficiência da SO e que o tratamento atualmente utilizado para a deficiência da ETHE1 não é totalmente

efetivo, avaliamos o efeito do antioxidante mitocondrial JP4-039 sobre algumas alterações observadas.

Inicialmente, através do sequenciamento dos genes envolvidos na deficiência da ETHE1 e da SO, determinamos as mutações responsáveis pelas deficiências enzimáticas observadas nos fibroblastos dos pacientes. Os fibroblastos de pacientes com deficiência da ETHE1 apresentaram diferentes mutações, sendo que células de dois pacientes (ETHE1-1 a ETHE1-4) apresentaram deleção do éxon 4, células de um paciente (ETHE1-2) apresentaram uma mutação *missense* homozigótica, e células de outro paciente (ETHE1-3) apresentaram uma mutação homozigótica no sítio de *splicing*. Já os fibroblastos do paciente com deficiência da SO possuíam mutações heterozigotas compostas do tipo *missense* no gene *MOCS1*, o qual codifica as proteínas de síntese do cofator molibdênio 1A e B (MOCS1A e MOCS1B), responsáveis pelo primeiro passo da via de biossíntese do cofator molibdênio (Figure 2). Dessa forma, essa mutação caracteriza a MoCD do tipo A. As mutações observadas nos fibroblastos estão de acordo com o conteúdo das enzimas observado através de *western blotting*, já que a enzima ETHE1 estava ausente nas células dos pacientes com deleção do éxon 4 e mutação no sítio de *splicing*, e presente nas células com mutação do tipo *missense*. Em relação ao paciente com MoCD, as mutações heterozigotas compostas do tipo *missense* levaram a uma diminuição do conteúdo de MOCS1 (proteínas MOCS1A e MOCS1B). É interessante ressaltar que embora as mutações nessas células tenham sido observadas no gene *MOCS1*, uma menor quantidade de SO foi também vista. Essa diminuição no conteúdo da SO poderia ser explicada pela importância do MoCo no processo de maturação

dessa enzima, uma vez que esse cofator é fundamental para o dobramento correto da SO e para a sua permanência no espaço intermembranas mitocondrial, além de ser importante para a integração do grupo heme e para a dimerização da enzima (Klein e Schwarz, 2012). Sendo assim, pode-se presumir que a ausência do MoCo funcional leva ao não dobramento correto da SO e ao seu retorno para o citosol, onde é degradada (Klein e Schwarz, 2012).

Nesse capítulo foi utilizada uma série de abordagens para a avaliação da bioenergética e da homeostase mitocondrial. Ao analisarmos a respiração mitocondrial, verificamos uma diminuição da respiração basal e máxima em fibroblastos deficientes para a ETHE1 e MOCS1, independente das mutações apresentadas por essas células. Em concordância com esses achados, vimos uma redução na produção de ATP nas células deficientes para a MOCS1 e em fibroblastos de dois pacientes com deficiência da ETHE1. Esses resultados também corroboram com estudos em camundongos *Ethe1*^{-/-} que mostram uma depleção de citocromo c oxidase em músculo, cérebro e colonócitos (Viscomi et al., 2010), e com trabalhos mostrando alterações na homeostase energética e mitocondrial em diversos tecidos de ratos na presença de H₂S e sulfito, os principais metabólitos acumulados na deficiência da ETHE1 e MoCD, respectivamente (Cardoso et al., 2017; Di Meo et al., 2011; Grings et al., 2013; Grings et al., 2014).

Considerando esses achados e o fato de as mitocôndrias serem organelas extremamente dinâmicas, possuindo um papel essencial na adaptação celular frente a insultos (Suarez-Rivero et al., 2016; van der Bliet et al., 2013; Westrate et al., 2014), determinamos o conteúdo das principais proteínas envolvidas na fusão (MFN1, MFN2 e OPA1) e fissão mitocondrial

(DRP1), além da massa mitocondrial. As células ETHE1-3 tiveram um aumento no conteúdo de todas as proteínas responsáveis pela fusão, enquanto que na célula ETHE1-2 houve uma diminuição de DRP1. Além disso, as células ETHE1-2 e ETHE1-4 apresentaram um aumento da massa mitocondrial. Por outro lado, nas células com deficiência da MOCS1 foram observados uma diminuição de MFN1 e MFN2, um aumento de DRP1 e um aumento da massa mitocondrial, indicando a presença de um grande número de mitocôndrias de tamanho menor. Ainda é interessante destacar que nessas células as proteínas de fusão mitocondrial que estão com conteúdo reduzido (MFN1 e MFN2) são responsáveis pela fusão da MME, enquanto que a OPA1, que não apresentou alteração, é responsável pela fusão da MMI. Tomadas em conjunto, essas alterações podem representar uma adaptação a menor taxa de respiração mitocondrial e síntese de ATP na tentativa de aumentar a produção de energia e reparar os componentes mitocondriais danificados (Benard et al., 2013; Crosbie et al., 1998; Guillery et al., 2008; Ikeda et al., 2014).

As alterações encontradas na bioenergética e dinâmica mitocondriais foram acompanhadas por um aumento na produção de superóxido nos fibroblastos de todos os pacientes. Esses achados estão de acordo com dados anteriores que mostram um desequilíbrio na homeostase redox em fibroblastos deficientes para a ETHE1 devido a alterações na regulação de enzimas envolvidas em processos de detoxificação e reações oxidantes e redutoras (Palmfeldt et al., 2011). Também já foi observado que o H₂S e o sulfito, além de prejudicarem a bioenergética, induzem estresse oxidativo em cérebro de ratos (Cardoso et al., 2017; Grings et al., 2013; Grings et al., 2014; Grings et al., 2016). Ressalte-se ainda que a mitocôndria, além de possuir como principal

função a produção de energia, é considerada a principal fonte de ânion superóxido, devido principalmente ao vazamento de elétrons dos complexo I e III da CTE (Cadenas e Davies, 2000; Han et al., 2001).

Danos à bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo também estão associados com alterações nos pontos de contato da mitocôndria com o RE (MAMs) e com o estresse do RE (Dandekar et al., 2015; Filadi et al., 2017; Lim et al., 2009; Yu et al., 2015). Em nossos estudos, observamos alterações no conteúdo das proteínas das MAMs, mais especificamente um conteúdo reduzido de VDAC1 e IP3R nos fibroblastos deficientes para a ETHE1 e MOCS1, indicando um prejuízo na interação entre mitocôndria e RE. Além disso, verificamos um aumento do conteúdo de DDIT3, uma proteína marcadora de estresse de RE e indutora de apoptose (Li et al., 2014), o que corrobora a indução desse processo observado nos fibroblastos dos pacientes.

Considerando o aumento na produção de ERO e o expressivo dano mitocondrial observados nos fibroblastos com deficiência enzimática, avaliamos os efeitos do JP4-039, um antioxidante direcionado à mitocôndria, sobre alguns dos parâmetros alterados nas células dos pacientes. Verificamos que o JP4-039 diminuiu os níveis de superóxido em todas as linhagens celulares e melhorou a respiração mitocondrial. Também estudamos os efeitos da NAC, um antioxidante utilizado no tratamento de pacientes com deficiência da ETHE1 (Kilic et al., 2017; Viscomi et al., 2010; Yis et al., 2015; Zafeiriou et al., 2007). Observamos que esse composto não diminuiu a produção de superóxido, indicando que o direcionamento de antioxidantes para a mitocôndria parece melhorar a eficiência de sequestradores de ERO em células deficientes para a ETHE1 e MOCS1.

É interessante chamar a atenção para os resultados heterogêneos apresentados pelas células deficientes para a ETHE1. Essas variações poderiam em parte ser explicadas pelas diferentes mutações observadas. Por outro lado, mesmo em fibroblastos de pacientes que apresentaram a mesma mutação (deleção do exon 4 nas células ETHE1-1 e ETHE1-4) também houve uma variabilidade na função e homeostase mitocondrial. Nesse contexto, deve-se considerar que, embora a deficiência da ETHE1 possua certas características fenotípicas do ponto de vista clínico, os sintomas dessa doença são bastante heterogêneos, não havendo uma correlação genótipo-fenótipo, inclusive em gêmeos monozigóticos (Di Meo et al., 1993; Kilic et al., 2017; Pigeon et al., 2009). Uma explicação para essa heterogeneidade e para a sua relação com a sintomatologia ainda necessita ser esclarecida, podendo eventualmente ser utilizada para a identificação de terapias específicas. Por outro lado, é difícil determinar a relevância fisiopatológica dos nossos achados e de extrapolá-los para outros tecidos afetados na deficiência da ETHE1 e da MOCS1, como por exemplo, o SNC. No entanto, sugere-se que as alterações vistas em fibroblastos possam ser ainda mais exacerbadas em tecidos com alta demanda energética, como o cérebro, devido a uma concentração aumentada de mitocôndria e a uma maior dependência da respiração aeróbica.

Por fim, comparando as alterações encontradas em fibroblastos de pacientes com a deficiência da ETHE1 e MoCD aos efeitos observados pelo sulfito e tiosulfato, metabólitos acumulados nessas doenças, em cérebro de ratos, verificamos algumas variações. Em relação à massa mitocondrial, por exemplo, vimos que o tratamento agudo com sulfito no capítulo dois levou a uma diminuição da massa mitocondrial, enquanto nos fibroblastos deficientes

para a MoCD houve um aumento desse parâmetro. Já o tratamento crônico com sulfito em ratos deficientes para a SO não causou nenhuma alteração na massa mitocondrial, porém diminuiu o $\Delta\psi_m$. Essas diferenças poderiam ser explicadas por uma possível adaptação celular. O sulfito administrado de maneira aguda pode induzir danos mitocondriais devido à produção de espécies reativas (Mottley e Mason, 1988) por esse composto e à possível indução da abertura do poro de MPT (Grings et al., 2014), resultando na degradação de mitocôndrias e na consequente diminuição da sua massa sem tempo suficiente para que a célula se adapte a esses insultos. Já o fato de não haver nenhuma alteração na massa mitocondrial em ratos deficientes para a SO tratados cronicamente pelo sulfito poderia ser devido ao período de tempo relativamente longo do tratamento, possibilitando a adaptação do cérebro aos efeitos tóxicos desse metabólito. Entretanto, as mitocôndrias presentes nesses animais não se encontram totalmente funcionais, uma vez que apresentam $\Delta\psi_m$ reduzido. Já em relação aos fibroblastos de pacientes com MoCD também pode ser especulado que essas células já estejam mais adaptadas às alterações induzidas pela deficiência da SO, de forma que o aumento da massa mitocondrial poderia ser um mecanismo compensatório para aumentar a produção de ATP. Contudo, essas organelas continuam danificadas, visto que mesmo com o aumento de seu conteúdo ainda se observa respiração mitocondrial reduzida. Apesar dessas variações, as mudanças observadas nos fibroblastos também indicam prejuízo na homeostase redox, na bioenergética e na função mitocondrial. Por outro lado, deve ser considerado que fibroblastos não representam o tipo celular ideal para o estudo de parâmetros bioenergéticos por não apresentarem grande quantidade de mitocôndrias.

Entretanto, estudos realizados nessas células podem refletir o que acontece em tecidos com maior demanda energética. Deve ainda ser destacado que, para o nosso conhecimento, fibroblastos são as únicas células de pacientes disponíveis para o estudo da fisiopatologia das deficiências da ETHE1 e MoCD, sendo, portanto, de grande utilidade.

III.2. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que o sulfito prejudica a capacidade antioxidante e a bioenergética em cérebro de ratos com deficiência da SO, e que o córtex cerebral e o estriado são as estruturas mais vulneráveis aos efeitos tóxicos do sulfito. Além disso, a administração de sulfito prejudica a sinalização de PGC-1 α no estriado, induz disfunção mitocondrial e altera as defesas antioxidantes resultando em reatividade glial e dano neuronal. Também demonstramos pela primeira vez que o tiosulfato causa alterações na bioenergética *in vivo*, e que, apesar de apresentar menor toxicidade quando comparado ao sulfito, também poderia contribuir para a progressão do dano neurológico. Em fibroblastos de pacientes com deficiência da ETHE1 e da SO (MoCD), verificamos danos à bioenergética e homeostase mitocondrial, às interações entre mitocôndria e RE, níveis elevados de superóxido, estresse do RE e aumento de apoptose. Todos esses achados ressaltam o importante papel da disfunção mitocondrial e redox na fisiopatologia da deficiência da ISOD, MoCD e ETHE1. Observamos também que o tratamento com bezafibrato protegeu o estriado da neurotoxicidade do sulfito. Já o antioxidante mitocondrial JP4-039 melhorou a respiração mitocondrial e reduziu a produção de ERO em fibroblastos de pacientes com deficiência da ETHE1 e MoCO,

apresentando efeitos mais benéficos em relação a NAC, atualmente utilizada no tratamento da deficiência da ETHE1. Acreditamos assim que o bezafibrato e o JP4-039 são candidatos promissores para futuros estudos em modelos animais e celulares de ISOD, MoCD e deficiência da ETHE1, bem como para testes clínicos visando avaliar os seus efeitos protetores como uma estratégia terapêutica para melhorar o prognóstico de pacientes com deficiência da SO e da ETHE1.

III.3. PERSPECTIVAS

- Avaliar os efeitos *in vivo* da administração intraestriatal de sulfito e tiosulfato sobre o conteúdo e a fosforilação de proteínas da via das proteínas cinases ativada por mitógenos (MAPK), proteínas envolvidas na resposta inflamatória e proteínas de fusão e fissão mitocondrial em estriado de ratos;
- Avaliar os efeitos *in vivo* da administração intraestriatal de sulfito e tiosulfato sobre a mielinização e sobre o conteúdo de proteínas constituintes da mielina em estriado de ratos;
- Avaliar os efeitos *in vivo* da administração intraestriatal de S-sulfocisteína sobre a homeostase mitocondrial e redox em estriado de ratos;
- Avaliar os efeitos do XJB-5-131, um antioxidante mitocondrial, sobre as alterações na função mitocondrial em fibroblastos de pacientes com deficiência da ETHE1 e MoCD;

REFERÊNCIAS

- Abedinzadeh, Z., 2001. Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. *Can J Physiol Pharmacol.* 79, 166-70.
- Ahmed, A., et al., 2016. Copper-Induced Inactivation of Camel Liver Glutathione S-Transferase. *Biol Trace Elem Res.* 169, 69-76.
- Albin, R.L., Greenamyre, J.T., 1992. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology.* 42, 733-8.
- Alfadhel, M., et al., 2013. Drug treatment of inborn errors of metabolism: a systematic review. *Arch Dis Child.* 98, 454-61.
- Alle, H., Roth, A., Geiger, J.R., 2009. Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science.* 325, 1405-8.
- Amaral, A.U., et al., 2012. Ethylmalonic acid impairs brain mitochondrial succinate and malate transport. *Mol Genet Metab.* 105, 84-90.
- Anderson, M.A., Ao, Y., Sofroniew, M.V., 2014. Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett.* 565, 23-9.
- Aoyama, K., Nakaki, T., 2015. Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). *Molecules.* 20, 8742-58.
- Aratani, Y., et al., 2012. [Role of neutrophil-derived reactive oxygen species in host defense and inflammation]. *Med Mycol J.* 53, 123-8.
- Arnold, S., 2012. The power of life--cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion.* 12, 46-56.
- Attwell, D., Laughlin, S.B., 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21, 1133-45.
- Baker, M.T., Dehring, D.J., Gregerson, M.S., 2002. Sulfite supported lipid peroxidation in propofol emulsions. *Anesthesiology.* 97, 1162-7.
- Basheer, S.N., et al., 2007. Isolated sulfite oxidase deficiency in the newborn: lactic acidemia and leukoencephalopathy. *Neuropediatrics.* 38, 38-41.
- Beaudet, A.L., et al., 2014. Genetics, Biochemistry, and Molecular Bases of Variant Human Phenotypes. Vol., D. Valle, A.L. Beaudet, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, S.E. Antonarakis, A. Ballabio, K. Gibson, G. Mitchell, eds. McGraw-Hill, New York, NY.
- Belaidi, A.A., et al., 2012. Molybdenum cofactor deficiency: a new HPLC method for fast quantification of s-sulfocysteine in urine and serum. *JIMD Rep.* 5, 35-43.
- Belanger, M., Allaman, I., Magistretti, P.J., 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* 14, 724-38.
- Benard, G., et al., 2013. Adaptive capacity of mitochondrial biogenesis and of mitochondrial dynamics in response to pathogenic respiratory chain dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 19, 350-65.
- Berhane, H., et al., 2014a. Radiologic differences between bone marrow stromal and hematopoietic progenitor cell lines from Fanconi Anemia (Fancd2(-/-)) mice. *Radiat Res.* 181, 76-89.
- Berhane, H., et al., 2014b. Amelioration of radiation-induced oral cavity mucositis and distant bone marrow suppression in fanconi anemia Fancd2(-/-) (FVB/N) mice by intraoral GS-nitroxide JP4-039. *Radiat Res.* 182, 35-49.

- Bertoldi, K., et al., 2012. Effect of landfill leachate on oxidative stress of brain structures and liver from rodents: modulation by photoelectrooxidation process. *Ecotoxicol Environ Saf.* 84, 319-24.
- Bickel, H., 1987. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme.* 38, 14-26.
- Bindu, P.S., et al., 2011. Clinical and imaging observations in isolated sulfite oxidase deficiency. *J Child Neurol.* 26, 1036-40.
- Bindu, P.S., et al., 2017. Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. In: *GeneReviews*((R)). Vol., M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya, ed.^eds., Seattle (WA).
- Bolanos, J.P., Almeida, A., Moncada, S., 2010. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci.* 35, 145-9.
- Brannan, T.S., et al., 1980. Regional distribution of glutathione peroxidase in the adult rat brain. *J Neurochem.* 35, 1013-4.
- Brizzolari, A., et al., 2017. Effect of organic co-solvents in the evaluation of the hydroxyl radical scavenging activity by the 2-deoxyribose degradation assay: The paradigmatic case of alpha-lipoic acid. *Biophys Chem.* 220, 1-6.
- Brustovetsky, N., et al., 2003. Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *J Neurosci.* 23, 4858-67.
- Burlina, A., et al., 1991. New clinical phenotype of branched-chain acyl-CoA oxidation defect. *Lancet.* 338, 1522-3.
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 29, 222-30.
- Cardoso, G.M.F., et al., 2017. Bioenergetics dysfunction, mitochondrial permeability transition pore opening and lipid peroxidation induced by hydrogen sulfide as relevant pathomechanisms underlying the neurological dysfunction characteristic of ethylmalonic encephalopathy. *Biochim Biophys Acta.* 1863, 2192-2201.
- Cecatto, C., et al., 2014. Ethylmalonic Acid induces permeability transition in isolated brain mitochondria. *Neurotox Res.* 26, 168-78.
- Chan, D.C., 2012. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet.* 46, 265-87.
- Chan, K.Y., et al., 2002. Infantile isolated sulphite oxidase deficiency in a Chinese family: a rare neurodegenerative disorder. *Hong Kong Med J.* 8, 279-82.
- Chang, J.Y., 1997. A two-stage mechanism for the reductive unfolding of disulfide-containing proteins. *J Biol Chem.* 272, 69-75.
- Chapman, K., 1993. Sulfite-containing pharmaceuticals. *CMAJ.* 148, 714.
- Chen, L.W., Tsai, Y.S., Huang, C.C., 2014. Prenatal multicystic encephalopathy in isolated sulfite oxidase deficiency with a novel mutation. *Pediatr Neurol.* 51, 181-2.
- Chiarani, F., et al., 2008. Sulfite increases lipoperoxidation and decreases the activity of catalase in brain of rats. *Metab Brain Dis.* 23, 123-32.
- Clarke, D.D., Sokoloff, L., 1999. Circulation and energy metabolism of the brain. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Vol., G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher, M.D. Uhler, ed.^eds. Lippincott-Raven, New York, pp. 637-669.
- Corona, J.C., Duchon, M.R., 2015. PPARgamma and PGC-1alpha as therapeutic targets in Parkinson's. *Neurochem Res.* 40, 308-16.

- Couto, N., Wood, J., Barber, J., 2016. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med.* 95, 27-42.
- Crosbie, R.H., et al., 1998. mdx muscle pathology is independent of nNOS perturbation. *Hum. Mol. Genet.* 7, 823-9.
- Dandekar, A., Mendez, R., Zhang, K., 2015. Cross talk between ER stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease. *Methods Mol Biol.* 1292, 205-14.
- De Keyser, J., Mostert, J.P., Koch, M.W., 2008. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci.* 267, 3-16.
- de Moura Alvorcem, L., et al., 2017. Disruption of Energy Transfer and Redox Status by Sulfite in Hippocampus, Striatum, and Cerebellum of Developing Rats. *Neurotox Res.* 32, 264-275.
- Delanty, N., Dichter, M.A., 1998. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand.* 98, 145-53.
- Deponte, M., 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1830, 3217-66.
- Derin, N., et al., 2006. The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities. *Toxicol Ind Health.* 22, 233-40.
- Derin, N., et al., 2009. Effect of alpha-lipoic acid on visual evoked potentials in rats exposed to sulfite. *Neurotoxicol Teratol.* 31, 34-9.
- Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 20, 649-88.
- Di Meo, I., Lamperti, C., Tiranti, V., 1993. Ethylmalonic Encephalopathy. In: *GeneReviews*((R)). Vol., M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya, ed.^eds., Seattle (WA).
- Di Meo, I., et al., 2011. Chronic exposure to sulfide causes accelerated degradation of cytochrome c oxidase in ethylmalonic encephalopathy. *Antioxid Redox Signal.* 15, 353-62.
- Di Meo, I., Lamperti, C., Tiranti, V., 2015. Mitochondrial diseases caused by toxic compound accumulation: from etiopathology to therapeutic approaches. *EMBO Mol Med.* 7, 1257-66.
- Di Meo, I., Lamperti, C., Tiranti, V., 2017. Ethylmalonic Encephalopathy. In: *GeneReviews*((R)). Vol., M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, A. Amemiya, ed.^eds., Seattle (WA).
- Di Rocco, M., et al., 2006. A case of ethylmalonic encephalopathy with atypical clinical and biochemical presentation. *Mol Genet Metab.* 89, 395-7.
- Dickinson, C., 1996. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clin Sci (Lond).* 91, 539-50.
- Ding, W.X., Yin, X.M., 2012. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem.* 393, 547-64.
- Dionisi-Vici, C., et al., 2016. Liver transplant in ethylmalonic encephalopathy: a new treatment for an otherwise fatal disease. *Brain.* 139, 1045-51.
- Dominy, J.E., Puigserver, P., 2013. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5.
- Drousiotou, A., et al., 2011. Ethylmalonic encephalopathy: application of improved biochemical and molecular diagnostic approaches. *Clin Genet.* 79, 385-90.

- Dubinsky, J.M., 2009. Heterogeneity of nervous system mitochondria: location, location, location! *Exp Neurol.* 218, 293-307.
- Dumont, M., et al., 2012. Bezafibrate administration improves behavioral deficits and tau pathology in P301S mice. *Hum Mol Genet.* 21, 5091-105.
- Edwards, M., et al., 2015. Investigation of molybdenum cofactor deficiency due to MOCS2 deficiency in a newborn baby. *Meta Gene.* 3, 43-9.
- Edwards, M.C., et al., 1999. Isolated sulfite oxidase deficiency: review of two cases in one family. *Ophthalmology.* 106, 1957-61.
- Eichler, F., et al., 2006. Proton magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted imaging in isolated sulfite oxidase deficiency. *J Child Neurol.* 21, 801-5.
- Erecińska, M., Silver, I., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 43, 37-71.
- Espinosa-Diez, C., et al., 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 6, 183-197.
- Eyaid, W.M., et al., 2005. An inborn error of metabolism presenting as hypoxic-ischemic insult. *Pediatr Neurol.* 32, 134-6.
- Fernandez-Marcos, P.J., Auwerx, J., 2011. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr.* 93, 884S-90.
- Filadi, R., Theurey, P., Pizzo, P., 2017. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium.* 62, 1-15.
- Finck, B.N., Kelly, D.P., 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* 116, 615-22.
- Frantz, M.C., et al., 2011. Large-scale asymmetric synthesis of the bioprotective agent JP4-039 and analogs. *Org Lett.* 13, 2318-21.
- Frantz, M.C., et al., 2013. Synthesis of analogs of the radiation mitigator JP4-039 and visualization of BODIPY derivatives in mitochondria. *Org Biomol Chem.* 11, 4147-53.
- Friberg, H., et al., 1999. Differences in the activation of the mitochondrial permeability transition among brain regions in the rat correlate with selective vulnerability. *J Neurochem.* 72, 2488-97.
- Galano, A., 2011. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Phys Chem Chem Phys.* 13, 7178-88.
- Gomez-Suaga, P., Paillusson, S., Miller, C.C.J., 2017. ER-mitochondria signaling regulates autophagy. *Autophagy.* 13, 1250-1251.
- Grings, M., et al., 2013. Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: Potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency. *Gene.* 531, 191-8.
- Grings, M., et al., 2014. Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification. *Biochim Biophys Acta.* 1842, 1413-22.
- Grings, M., et al., 2016. Higher susceptibility of cerebral cortex and striatum to sulfite neurotoxicity in sulfite oxidase-deficient rats. *Biochim Biophys Acta.* 1862, 2063-2074.
- Grings, M., et al., 2017. Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, antioxidant system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: Implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency. *Biochim*

- Biophys Acta. 1863, 2135-2148.
- Grosso, S., et al., 2004. Brain mitochondrial impairment in ethylmalonic encephalopathy. *J Neurol.* 251, 755-6.
- Guillery, O., et al., 2008. Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts. *Neuromuscul. Disord.* 18, 319-330.
- Gunnison, A.F., Palmes, E.D., 1973. Persistence of plasma S-sulfonates following exposure of rabbits to sulfite and sulfur dioxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 24, 266-78.
- Gunnison, A.F., 1981. Sulphite toxicity: a critical review of in vitro and in vivo data. *Food Cosmet Toxicol.* 19, 667-82.
- Gunnison, A.F., Jacobsen, D.W., 1987. Sulfite hypersensitivity. A critical review. *CRC Crit Rev Toxicol.* 17, 185-214.
- Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18, 685-716.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2007. Measurement of reactive species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol., B. Halliwell, J. Gutteridge, ed.^eds. Oxford University Press Inc., New York, pp. 268-340.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015a. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol., H. B, G. JMC, ed.^eds. Oxford University Press Inc., New York, pp. 199-283.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015b. Measurement of reactive species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol., H. B, G. JMC, ed.^eds. Oxford University Press Inc., New York, pp. 284-353.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015c. Antioxidants from the diet. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol., H. B, G. JMC, ed.^eds. Oxford University Press Inc., New York, pp. 153-197.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015d. Reactive species in disease: friends or foes? In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol., H. B, G. JMC, ed.^eds. Oxford University Press Inc., New York, pp. 511-638.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015e. Antioxidant defenses synthesized *in vivo*. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol., H. B, G. JMC, ed.^eds. Oxford University Press Inc., New York, pp. 77-151.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2015f. Oxygen: boon yet bane - introducing oxygen toxicity and reactive species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol., H. B, G. JMC, ed.^eds. Oxford University Press Inc., New York, pp. 1-29.
- Hamann, I., et al., 2014. Insulin-like modulation of Akt/FoxO signaling by copper ions is independent of insulin receptor. *Arch Biochem Biophys.* 558, 42-50.
- Han, D., Williams, E., Cadenas, E., 2001. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J.* 353, 411-6.
- Havemeyer, A., Lang, J., Clement, B., 2011. The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metab Rev.* 43, 524-39.
- Hayon, E., Treinin, A., Wilf, J., 1972. Electronic spectra, photochemistry, and autoxidation mechanism of the sulfite-bisulfite-pyrosulfite systems. *The*

- SO₂·, SO₃·, SO₄·, and SO₅· radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 47-57.
- Held, N.M., Houtkooper, R.H., 2015. Mitochondrial quality control pathways as determinants of metabolic health. *Bioessays.* 37, 867-76.
- Henriques, B.J., et al., 2014. Ethylmalonic encephalopathy ETHE1 R163W/R163Q mutations alter protein stability and redox properties of the iron centre. *PLoS One.* 9, e107157.
- Herken, E.N., et al., 2009. Effect of sulfite treatment on total antioxidant capacity, total oxidant status, lipid hydroperoxide, and total free sulfhydryl groups contents in normal and sulfite oxidase-deficient rat plasma. *Cell Biol Toxicol.* 25, 355-62.
- Higuchi, R., et al., 2014. Early features in neuroimaging of two siblings with molybdenum cofactor deficiency. *Pediatrics.* 133, e267-71.
- Hihi, A.K., Michalik, L., Wahli, W., 2002. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci.* 59, 790-8.
- Hildebrandt, T.M., Grieshaber, M.K., 2008. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J.* 275, 3352-61.
- Hobson, E.E., et al., 2005. Isolated sulphite oxidase deficiency mimics the features of hypoxic ischaemic encephalopathy. *Eur J Pediatr.* 164, 655-9.
- Hoffmann, C., et al., 2007. Magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopy in isolated sulfite oxidase deficiency. *J Child Neurol.* 22, 1214-21.
- Holder, J.L., Jr., et al., 2014. Infantile spasms and hyperekplexia associated with isolated sulfite oxidase deficiency. *JAMA Neurol.* 71, 782-4.
- Hondares, E., et al., 2006. Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1 α gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1 α expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology.* 147, 2829-38.
- Hondares, E., et al., 2007. PPAR δ , but not PPAR α , activates PGC-1 α gene transcription in muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 354, 1021-7.
- Hondares, E., et al., 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem.* 286, 43112-22.
- Ikeda, Y., et al., 2014. Endogenous Drp1 Mediates Mitochondrial Autophagy and Protects the Heart Against Energy Stress. *Circulation Research.* 116, 264-278.
- Ingerman, E., et al., 2005. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol.* 170, 1021-7.
- Ingles, M., et al., 2016. Active paraplegics are protected against exercise-induced oxidative damage through the induction of antioxidant enzymes. *Spinal Cord.* 54, 830-837.
- Irani, K., 2000. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 87, 179-83.
- Jackson, M.R., Melideo, S.L., Jorns, M.S., 2012. Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry.* 51, 6804-15.

- Ji, A.J., Savon, S.R., Jacobsen, D.W., 1995. Determination of total serum sulfite by HPLC with fluorescence detection. *Clin Chem.* 41, 897-903.
- Johnson, J.L., Rajagopalan, K.V., Cohen, H.J., 1974. Molecular basis of the biological function of molybdenum. Effect of tungsten on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat. *J Biol Chem.* 249, 859-66.
- Johnson, J.L., Duran, M., 2001. Molybdenum Cofactor Deficiency and Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol., C.R. Scriver, A.L. Beaudet, D. Valle, W.S. Sly, eds., McGraw-Hill, New York, pp. 3181-3217.
- Johnson, J.L., 2003. Prenatal diagnosis of molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. *Prenat Diagn.* 23, 6-8.
- Johri, A., et al., 2012. Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 21, 1124-37.
- Kabil, O., Banerjee, R., 2012. Characterization of patient mutations in human persulfide dioxygenase (ETHE1) involved in H₂S catabolism. *J Biol Chem.* 287, 44561-7.
- Keller, D.A., Menzel, D.B., 1989. Effects of sulfite on glutathione S-sulfonate and the glutathione status of lung cells. *Chem Biol Interact.* 70, 145-56.
- Kersten, S., Desvergne, B., Wahli, W., 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature.* 405, 421-4.
- Kilic, M., et al., 2017. Successful treatment of a patient with ethylmalonic encephalopathy by intravenous N-acetylcysteine. *Metab Brain Dis.* 32, 293-296.
- Kim, J.S., He, L., Lemasters, J.J., 2003. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 304, 463-70.
- Kisker, C., et al., 1997. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell.* 91, 973-83.
- Klein, J.M., Schwarz, G., 2012. Cofactor-dependent maturation of mammalian sulfite oxidase links two mitochondrial import pathways. *J Cell Sci.* 125, 4876-85.
- Knott, A.B., et al., 2008. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 9, 505-18.
- Kocamaz, E., et al., 2012. Sulfite leads to neuron loss in the hippocampus of both normal and SOX-deficient rats. *Neurochem Int.* 61, 341-6.
- Komen, J.C., Thorburn, D.R., 2014. Turn up the power - pharmacological activation of mitochondrial biogenesis in mouse models. *Br J Pharmacol.* 171, 1818-36.
- Kucukatay, V., et al., 2006. Visual evoked potentials in normal and sulfite oxidase deficient rats exposed to ingested sulfite. *Neurotoxicology.* 27, 93-100.
- Küçükataay, V., et al., 2005. Effect of sulfite on cognitive function in normal and sulfite oxidase deficient rats. *Neurotoxicol Teratol.* 27, 47-54.
- Kumar, A., et al., 2017. S-sulfocysteine/NMDA receptor-dependent signaling underlies neurodegeneration in molybdenum cofactor deficiency. *J Clin Invest.*
- Leipnitz, G., et al., 2003. Ethylmalonic acid inhibits mitochondrial creatine kinase activity from cerebral cortex of young rats in vitro. *Neurochem Res.* 28, 771-7.

- Leipnitz, G., et al., 2018. Evaluation of mitochondrial bioenergetics, dynamics, endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk, and reactive oxygen species in fibroblasts from patients with complex I deficiency. *Sci Rep.* 8, 1165.
- Lemasters, J.J., et al., 2002. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 4, 769-81.
- Leung, K.H., Post, G.B., Menzel, D.B., 1985. Glutathione S-sulfonate, a sulfur dioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 77, 388-94.
- Li, C., et al., 2011. Hydrogen peroxide targets the cysteine at the active site and irreversibly inactivates creatine kinase. *Int J Biol Macromol.* 49, 910-6.
- Li, Y., et al., 2014. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 46, 629-40.
- Lieberman, M.A., Marks, A.D., 2009. *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, Vol.*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Lim, J.H., et al., 2009. Coupling mitochondrial dysfunction to endoplasmic reticulum stress response: a molecular mechanism leading to hepatic insulin resistance. *Cell Signal.* 21, 169-77.
- Lin, J., et al., 2004. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell.* 119, 121-35.
- Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1830, 3143-53.
- Magistretti, P.J., Allaman, I., 2015. A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron.* 86, 883-901.
- Mak, C.M., et al., 2013. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 50, 142-62.
- Marmolino, D., et al., 2010. PGC-1alpha down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich's ataxia. *PLoS One.* 5, e10025.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 23, 474-83.
- Mineri, R., et al., 2008. Identification of new mutations in the ETHE1 gene in a cohort of 14 patients presenting with ethylmalonic encephalopathy. *J Med Genet.* 45, 473-8.
- Mottley, C., Mason, R.P., 1988. Sulfate anion free radical formation by the peroxidation of (Bi)sulfite and its reaction with hydroxyl radical scavengers. *Arch Biochem Biophys.* 267, 681-9.
- Murakami, K., et al., 2014. Copper-dependent inhibition and oxidative inactivation with affinity cleavage of yeast glutathione reductase. *Biometals.* 27, 551-8.
- Nagele, R.G., et al., 2004. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 25, 663-74.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry, Vol.*, Freeman, W. H. & Company.
- Neta, P., Huie, R.E., 1985. Free-radical chemistry of sulfite. *Environ Health Perspect.* 64, 209-17.
- Ni, H.M., Williams, J.A., Ding, W.X., 2015. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol.* 4, 6-13.
- Nishino, H., et al., 2000. The striatum is the most vulnerable region in the brain to mitochondrial energy compromise: a hypothesis to explain its specific

- vulnerability. *J Neurotrauma*. 17, 251-60.
- Noe, N., et al., 2013. Bezafibrate improves mitochondrial function in the CNS of a mouse model of mitochondrial encephalopathy. *Mitochondrion*. 13, 417-26.
- Olivera-Bravo, S., et al., 2011. Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. *PLoS ONE*. 6, e20831.
- Ozsoy, O., et al., 2014. The effect of ingested sulfite on visual evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant status of brain in normal and sulfite oxidase-deficient aged rats. *Toxicol Ind Health*.
- Ozturk, N., et al., 2011. Dose-dependent effect of nutritional sulfite intake on visual evoked potentials and lipid peroxidation. *Neurotoxicol Teratol*. 33, 244-54.
- Palmfeldt, J., et al., 2011. Proteomics reveals that redox regulation is disrupted in patients with ethylmalonic encephalopathy. *J Proteome Res*. 10, 2389-96.
- Papetti, L., et al., 2015. Severe early onset ethylmalonic encephalopathy with West syndrome. *Metab Brain Dis*. 30, 1537-45.
- Parmeggiani, B., et al., 2015. In vitro evidence that sulfite impairs glutamatergic neurotransmission and inhibits glutathione metabolism-related enzymes in rat cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci*. 42, 68-75.
- Patten, D.A., et al., 2014. OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *EMBO J*. 33, 2676-91.
- Pellerin, L., 2005. How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol*. 32, 59-72.
- Per, H., et al., 2007. Molybdenum cofactor deficiency: clinical features in a Turkish patient. *Brain Dev*. 29, 365-8.
- Picard, M., Wallace, D.C., Burelle, Y., 2016. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*. 30, 105-16.
- Pigeon, N., et al., 2009. Clinical heterogeneity in ethylmalonic encephalopathy. *J Child Neurol*. 24, 991-6.
- Powell, M.A., Somero, G.N., 1986. Hydrogen Sulfide Oxidation Is Coupled to Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of *Solemya reidi*. *Science*. 233, 563-6.
- Ranguelova, K., et al., 2012. Formation of reactive sulfite-derived free radicals by the activation of human neutrophils: an ESR study. *Free Radic Biol Med*. 52, 1264-71.
- Rasola, A., Bernardi, P., 2011. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*. 50, 222-33.
- Rhein, V., et al., 2009. Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol*. 29, 1063-71.
- Ricci, G., et al., 1991. Redox forms of human placenta glutathione transferase. *J Biol Chem*. 266, 21409-15.
- Ritter, L., et al., 2015. Disturbance of energy and redox homeostasis and reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity provoked by in vivo intracerebral administration of ethylmalonic acid to young rats. *Biochim Biophys Acta*. 1852, 759-67.
- Rizzuto, R., et al., 1993. Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. 262,

744-7.

- Rizzuto, R., et al., 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*. 280, 1763-6.
- Rowland, A.A., Voeltz, G.K., 2012. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13, 607-25.
- Rudic, J.S., et al., 2012. Bezafibrate for primary biliary cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 1, CD009145.
- Rupar, C.A., et al., 1996. Isolated sulfite oxidase deficiency. *Neuropediatrics*. 27, 299-304.
- Sadat-Shafaï, T., Pucheault, J., Ferradini, C., 1981. A radiolysis study of the role of superoxide ion in the oxidation of sulfite by oxygen. *Radiat. Phys. Chem*. 17, 283-288.
- Sass, J.O., et al., 2010. Functional deficiencies of sulfite oxidase: Differential diagnoses in neonates presenting with intractable seizures and cystic encephalomalacia. *Brain Dev*. 32, 544-9.
- Sauer, S.W., et al., 2009. Long-term exposure of human proximal tubule cells to hydroxycobalamin[c-lactam] as a possible model to study renal disease in methylmalonic acidurias. *J Inherit Metab Dis*. 32, 720-7.
- Sauerbeck, A., et al., 2011. Analysis of regional brain mitochondrial bioenergetics and susceptibility to mitochondrial inhibition utilizing a microplate based system. *J Neurosci Methods*. 198, 36-43.
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 30, 1191-212.
- Scherz-Shouval, R., Elazar, Z., 2011. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*. 36, 30-8.
- Schmitz, F., et al., 2012. Methylphenidate induces lipid and protein damage in prefrontal cortex, but not in cerebellum, striatum and hippocampus of juvenile rats. *Metab Brain Dis*. 27, 605-12.
- Schuck, P.F., et al., 2010. Promotion of lipid and protein oxidative damage in rat brain by ethylmalonic acid. *Neurochem Res*. 35, 298-305.
- Schuck, P.F., et al., 2015. Brain and muscle redox imbalance elicited by acute ethylmalonic acid administration. *PLoS One*. 10, e0126606.
- Schwahn, B.C., et al., 2015. Efficacy and safety of cyclic pyranopterin monophosphate substitution in severe molybdenum cofactor deficiency type A: a prospective cohort study. *Lancet*. 386, 1955-63.
- Schwarz, G., 2005. Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell Mol Life Sci*. 62, 2792-810.
- Schwarz, G., Mendel, R.R., Ribbe, M.W., 2009. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature*. 460, 839-47.
- Schwarz, G., 2016. Molybdenum cofactor and human disease. *Curr Opin Chem Biol*. 31, 179-87.
- Scriver, C.R., et al., 2001. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol., McGraw-Hill, New York.
- Shen, H., et al., 1993. Identification of cysteine residues involved in disulfide formation in the inactivation of glutathione transferase P-form by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys*. 300, 137-41.
- Shinde, A., et al., 2016. Intraoral Mitochondrial-Targeted GS-Nitroxide, JP4-039, Radioprotects Normal Tissue in Tumor-Bearing Radiosensitive *Fancd2(-/-)* (C57BL/6) Mice. *Radiat Res*. 185, 134-50.

- Singh, P., Jain, A., Kaur, G., 2004. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol Cell Biochem.* 260, 153-9.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7-35.
- Sokoloff, L., 1993. Function-related changes in energy metabolism in the nervous system: localization and mechanisms. *Keio J Med.* 42, 95-103.
- Southorn, P.A., Powis, G., 1988. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 63, 381-9.
- St-Pierre, J., et al., 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 127, 397-408.
- Stence, N.V., et al., 2013. Distinctive pattern of restricted diffusion in a neonate with molybdenum cofactor deficiency. *Pediatr Radiol.* 43, 882-5.
- Suarez-Rivero, J.M., et al., 2016. Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases.* 5.
- Sweeney, G., Song, J., 2016. The association between PGC-1alpha and Alzheimer's disease. *Anat Cell Biol.* 49, 1-6.
- Szabadkai, G., et al., 2006. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol.* 175, 901-11.
- Tamura, H., et al., 2013. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr J.* 60, 1-13.
- Tan, W.H., et al., 2005. Isolated sulfite oxidase deficiency: a case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics.* 116, 757-66.
- Tavasoli, A.R., et al., 2017. Neurological and Vascular Manifestations of Ethylmalonic Encephalopathy. *Iran J Child Neurol.* 11, 57-60.
- Taylor, S.L., Higley, N.A., Bush, R.K., 1986. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Adv Food Res.* 30, 1-76.
- Teksam, O., Yurdakok, M., Coskun, T., 2005. Molybdenum cofactor deficiency presenting with severe metabolic acidosis and intracranial hemorrhage. *J Child Neurol.* 20, 155-7.
- Tenenbaum, A., Motro, M., Fisman, E.Z., 2005. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovasc Diabetol.* 4, 14.
- Tiranti, V., et al., 2004. Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *Am J Hum Genet.* 74, 239-52.
- Tiranti, V., et al., 2006. ETHE1 mutations are specific to ethylmalonic encephalopathy. *J Med Genet.* 43, 340-6.
- Tiranti, V., et al., 2009. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat Med.* 15, 200-5.
- Tiranti, V., Zeviani, M., 2013. Altered sulfide (H₂S) metabolism in ethylmalonic encephalopathy. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5, a011437.
- Touati, G., et al., 2000. Dietary therapy in two patients with a mild form of sulphite oxidase deficiency. Evidence for clinical and biological improvement. *J Inher Metab Dis.* 23, 45-53.
- van der Blik, A.M., Shen, Q., Kawajiri, S., 2013. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5.
- Veldman, A., et al., 2010. Successful treatment of molybdenum cofactor

- deficiency type A with cPMP. *Pediatrics*. 125, e1249-54.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V., 2008. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res*. 79, 208-17.
- Vernon, H.J., 2015. Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy. *JAMA Pediatr*. 169, 778-82.
- Vijayakumar, K., et al., 2011. Clinical neuroimaging features and outcome in molybdenum cofactor deficiency. *Pediatr Neurol*. 45, 246-52.
- Vincent, A.S., et al., 2004. Sulfite-mediated oxidative stress in kidney cells. *Kidney Int*. 65, 393-402.
- Viscomi, C., et al., 2010. Combined treatment with oral metronidazole and N-acetylcysteine is effective in ethylmalonic encephalopathy. *Nat Med*. 16, 869-71.
- Wall, S.B., et al., 2012. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling. *Front Physiol*. 3, 369.
- Wang, P.F., et al., 2001. An unusually low pK(a) for Cys282 in the active site of human muscle creatine kinase. *Biochemistry*. 40, 11698-705.
- Ward, R., Peters, T., 1995. Free Radicals. In: *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. Vol., W. Marshall, S. Bangert, ed. eds. Churchill Livingstone, New York, pp. 765-777.
- Webb, R., et al., 2017. The Ability of Exercise-Associated Oxidative Stress to Trigger Redox-Sensitive Signalling Responses. *Antioxidants (Basel)*. 6.
- Wendt, S., Schlattner, U., Wallimann, T., 2003. Differential effects of peroxynitrite on human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. Inactivation, octamer destabilization, and identification of involved residues. *J Biol Chem*. 278, 1125-30.
- Wenz, T., et al., 2008. Activation of the PPAR/PGC-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab*. 8, 249-56.
- Westermann, B., 2011. Organelle dynamics: ER embraces mitochondria for fission. *Curr Biol*. 21, R922-4.
- Westrate, L.M., et al., 2014. Mitochondrial morphological features are associated with fission and fusion events. *PLoS One*. 9, e95265.
- Weydt, P., et al., 2006. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab*. 4, 349-62.
- Wilson, H.L., Rajagopalan, K.V., 2004. The role of tyrosine 343 in substrate binding and catalysis by human sulfite oxidase. *J Biol Chem*. 279, 15105-13.
- Wipf, P., et al., 2005. Mitochondrial targeting of selective electron scavengers: synthesis and biological analysis of hemigramicidin-TEMPO conjugates. *J Am Chem Soc*. 127, 12460-1.
- Woo, W.H., et al., 2003. Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 305, 619-23.
- Yis, U., et al., 2015. Importance of acrocyanosis in delayed walking. *J Pediatr Neurosci*. 10, 80-1.
- Yoshida, M., et al., 2015. Low molybdenum state induced by tungsten as a model of molybdenum deficiency in rats. *Biol Trace Elem Res*. 165, 75-80.

- Yu, C., et al., 2012. A fast-responding fluorescent turn-on sensor for sensitive and selective detection of sulfite anions. *Anal Methods*. 4, 2638-2640.
- Yu, K.N., et al., 2015. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death via Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane Disruption in Normal Lung Cells. *PLoS One*. 10, e0131208.
- Zafeiriou, D.I., et al., 2007. Ethylmalonic encephalopathy: clinical and biochemical observations. *Neuropediatrics*. 38, 78-82.
- Zaki, M.S., et al., 2016. Molybdenum cofactor and isolated sulphite oxidase deficiencies: Clinical and molecular spectrum among Egyptian patients. *Eur J Paediatr Neurol*. 20, 714-22.
- Zhang, X., et al., 2004. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 279, 43035-45.
- Zheng, B., et al., 2010. PGC-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Sci Transl Med*. 2, 52ra73.