

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

Newton Teixeira da Rosa Junior

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM BEZAFIBRATO
SOBRE OS EFEITOS DO ÁCIDO 3-METILGLUTÁRICO NA HOMEOSTASE
REDOX E ENERGÉTICA EM CÉREBRO E FÍGADO DE RATOS JOVENS**

Porto Alegre, 12 de Maio de 2021

Newton Teixeira da Rosa Junior

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM BEZAFIBRATO
SOBRE OS EFEITOS DO ÁCIDO 3-METILGLUTÁRICO NA HOMEOSTASE
REDOX E ENERGÉTICA EM CÉREBRO E FÍGADO DE RATOS JOVENS**

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

Orientador: Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Porto Alegre

2021

“..a alegria está na luta, no processo e na estrada percorrida e em algumas palhaçadas permitidas...”

Da Rosa Junior, “Letra e Música”

Ficha catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

Teixeira Da Rosa Junior, Newton
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM
BEZAFIBRATO SOBRE OS EFEITOS DO ÁCIDO 3-METILGLUTÁRICO
NA HOMEOSTASE REDOX E ENERGÉTICA EM CÉREBRO E FÍGADO
DE RATOS JOVENS / Newton Teixeira Da Rosa Junior. --
2021.
99 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, 2021.

1. Ácido 3-Metilglutárico. 2. Homeostase redox. 3.
Biogênese mitocondrial. 4. Bezafibrato. I. Leipnitz,
Guilhian, orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus professores e meus mestres, pois sem que eles tivessem instigado o garoto pobre e interessado, o meu despertar científico provavelmente não teria acontecido. No que concerne a meu Doutorado, tenho muito o que agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Guilhian Leipnitz. Primeiramente por descer do palco e me tratar como um colega de trabalho mesmo eu sendo seu orientando, por entender minhas imperfeições, minhas deficiências, por confiar na minha capacidade de trabalhar sozinho e acreditar nas minhas ideias e raciocínios científicos. Um indivíduo íntegro e equilibrado no tocante a sua face professor, cientista e “ser humano”, mas certamente o que tornou e torna todas as nossas conversas nestes 4 anos proveitosas é a sua capacidade de usar o bom senso nas decisões para comigo, claramente salientando sua humanidade para com seus alunos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de mestrado e doutorado pois sem este apoio é impossível desenvolver ciência no Brasil.

Aos meus amigos, colegas e ICs de todos os laboratórios os quais me relacionei neste doutorado. Particularmente, Belisa S.P., Mateus G., Mateus S., Nicolas G., Leonardo M.A., Marina, Julia, Leo e Cleversson dentre outros.

A minha esposa que tem estado ao meu lado mesmo com todas as incertezas presentes na vida acadêmica-científica no Brasil. Por todo seu apoio moral e por acreditar no meu impenho acadêmico em todos os dias de nossa vida

juntos e por todo aprendizado e desenvolvimento os quais nossa relação no trouxe e ainda nos traz diariamente.

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 ACIDÚRIAS 3-METILGLUTACÔNICAS-MGTA	8
I.1.3 MGTA DO TIPO I.....	8
I.1.4 MGTA DO TIPO II.....	10
I.1.5 MGTA DO TIPO III.....	13
I.1.6 MGTA DO TIPO IV.....	16
I.1.7 MGTA DO TIPO V.....	18
I.1.8 ACIDURIA 3-HIDRÓXI-3-METILGLUTÁRICA.....	19
I.1.9 FISIOPATOLOGIA.....	21
HOMEOSTASE REDOX.....	23
I.1.9.1 ESPÉCIES REATIVAS E RADICAIS LIVRES.....	23
I.1.9.2 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	24
I.1.9.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
I.2 FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	27
I.3 BEZAFIBRATO.....	29
I.4 OBJETIVOS.....	31

I.4.1 OBJETIVO GERAL.....	31
I.4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
PARTE II.....	33
CAPÍTULO I.....	34
CAPÍTULO II.....	49
PARTE III.....	60
III.1 DISCUSSÃO.....	61
III.2 CONCLUSÕES.....	79
III.3 PERSPECTIVAS.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
LISTA DE FIGURAS.....	97
ANEXO 1.....	99

PARTE I
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

RESUMO

O acúmulo tecidual do ácido 3-metilglutárico (MGA) é um achado bioquímico característico de um grupo de doenças conhecidas como acidúria 3-metilglutacônica (MGTA), bem como da acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica (HMGA). Tanto as MGTA quanto a HMGA são doenças genéticas de herança autossômica recessiva cujos sintomas podem aparecer na infância ou na adolescência. Os pacientes geralmente apresentam anormalidades no cérebro, fígado e coração. Considerando que os mecanismos responsáveis pelo dano tecidual encontrado nessas doenças não estão totalmente estabelecidos, esta tese avaliou os efeitos da administração de MGA sobre o metabolismo energético, estresse oxidativo, biogênese mitocondrial e vias metabólicas relacionadas em córtex cerebral e fígado de ratos. Além disso, investigamos os efeitos do bezafibrato (BEZ), uma molécula potencialmente protetora, frente aos efeitos de MGA visto que o tratamento para as MGTA e a HMGA é bastante limitado. Para isso, ratos Wistar jovens receberam um pré-tratamento por gavagem com óleo de milho ou BEZ (30 ou 100mg/kg/dia) por sete dias, uma vez ao dia. No 30º dia de vida, os animais receberam, após 1 h da gavagem com óleo (veículo) ou BEZ, três injeções intraperitoneais de MGA ou NaCl (primeira injeção de $10\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ seguida de duas de $5\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) com intervalo de 90 minutos entre as injeções. Após eutanásia dos ratos, o córtex cerebral e o fígado foram usados para avaliar os parâmetros. O MGA aumentou os níveis de malondialdeído e o conteúdo de heme oxigenase-1 e ainda modulou a atividade de algumas enzimas antioxidantes, indicando um quadro de estresse oxidativo. O MGA também diminuiu o conteúdo de glutathiona no fígado. Foi visto ainda que o MGA alterou a atividade das enzimas da cadeia transportadora de elétrons em ambos os tecidos, sugerindo alterações na bioenergética. O MGA diminuiu o conteúdo nuclear do PGC-1 α , principal regulador da biogênese mitocondrial, no cérebro e mostrou forte tendência em causar a mesma alteração no fígado. Além disso, o MGA diminuiu o conteúdo de sirtuína 1 nos dois tecidos, sendo esta uma proteína chave para ativação de PGC-1 α . O MGA ainda diminuiu o conteúdo de Akt nos tecidos, indicando que alterações nesta via também podem estar prejudicando a ativação de PGC-1 α . No que concerne especificamente ao córtex cerebral, o MGA também diminuiu o conteúdo de sinaptofisina e aumentou a fosforilação da Tau. Este ácido ainda aumentou a fosforilação da ERK1/2 e p38, e aumentou o conteúdo de AMPK α 1, sendo este último também aumentado no fígado. No que diz respeito ao fígado, o MGA reduziu o conteúdo de PPAR α nuclear em relação ao citosólico, e também alterou o conteúdo de mitofusina 1 e proteína relacionada à dinamina 1, indicando um prejuízo à dinâmica mitocondrial. Nossos dados sugerem uma toxicidade relevante do MGA neste modelo, causando disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e danos aos tecidos estudados. Além disso, nossos resultados mostraram que o BEZ exerceu efeitos benéficos na prevenção dos efeitos do MGA tanto no córtex cerebral quanto em fígado. Contudo, foi observado que o BEZ exerceu maior ação protetora no cérebro. Portanto, nossos dados sugerem que o MGA tem um papel importante na fisiopatologia dos danos cerebral e hepático verificados nos pacientes com MGTA e HMGA e que o BEZ pode ser considerado um fármaco promissor para o tratamento dessas patologias.

Palavras-chave: Ácido 3-Metilglutárico; Homeostase redox; Biogênese mitocondrial; Dano neural; Bezafibrato; Córtex cerebral; Fígado.

ABSTRACT

Tissue accumulation of 3-methylglutaric acid (MGA) is an important biochemical finding observed in a group of disorders collectively called 3-methylglutaconic acidurias (MGTA), and also in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria (HMGA). All types of MGTA and HMGA are autosomal recessive inherited diseases. Symptoms usually appear during childhood or adolescence, and affect especially the central nervous system, liver and heart. Since the mechanisms underlying the organ abnormalities commonly observed in patients affected by MGTA and HMGA are not fully elucidated, we investigated here the effects of MGA administration on redox homeostasis, mitochondrial bioenergetics, biogenesis and dynamics, and signaling pathways in brain and liver of young rats. As treatment for these disorders is limited, the effects of a pre-treatment with bezafibrate (BEZ), a potential protective molecule, were also determined. In our model, young Wistar rats received three intraperitoneal injections of NaCl (control) or MGA (one injection of 10 $\mu\text{mol/g}$ followed by two injections of 5 $\mu\text{mol/g}$ with a 90-min interval) and were euthanized 1 h after the last injection. Pre-treatment with BEZ (30 or 100 mg/kg/day) was performed by gavage for 7 days before NaCl or MGA injection. After euthanasia of animals, liver and brain homogenates were prepared to evaluate the parameters. MGA administration induced marked toxicity in both tissues evaluated. We verified that MGA increased the levels of malondialdehyde and heme oxygenase-1, and altered the activity of several antioxidant enzymes, indicative of oxidative stress. MGA also decreased GSH levels in liver. Furthermore, MGA altered the activities of respiratory chain complexes in brain and liver, suggesting bioenergetic dysfunction. MGA also decreased the content of nuclear PGC-1 α in brain, and showed a strong tendency to decrease this protein in liver. MGA further reduced the content of situin 1 in both tissues. Considering that situin 1 is an activator of PGC-1 α , the master regulator of mitochondrial biogenesis, our data indicate mitochondrial biogenesis disruption. In addition, MGA decreased the content of Akt, which may be also involved in the mitochondrial biogenesis disturbances. Regarding only the brain, MGA resulted in decreased content of synaptophysin and increased Tau protein phosphorylation. MGA also increased the phosphorylation of ERK1/2, p38, and the content of AMPK α 1 in the brain. In liver, MGA decreased the nuclear content of PPAR γ compared to the cytosolic compartment, augmented AMPK α 1 levels and altered the levels of mitofusin 1 and dynamin-related protein 1, reinforcing the data showing that MGA disturbs in mitochondrial biogenesis and also indicating mitochondrial dynamics alterations. We also verified that bezafibrate was able to prevent most deleterious effects caused by MGA. Of note, these protective effects elicited by bezafibrate were more pronounced in the cerebral cortex than in liver. These findings indicate that MGA plays an important role in the neurological symptoms and hepatic dysfunction observed in MGTA and HMGA by inducing oxidative stress and causing mitochondrial dysfunction. Finally, our study suggests that bezafibrate may be a novel therapeutic strategy for these disorders.

Keywords: 3-Methylglutaric acid; Redox homeostasis; Mitochondrial biogenesis; Neural damage; Bezafibrate; Cerebral cortex; Liver.

LISTA DE ABREVIATURAS

AO – Atrofia óptica
AKT – Proteína cinase B
AMPK – Proteína cinase ativada por adenosina monofosfato
BEZ – Bezafibrato
CAT – Catalase
CL – Cardiolipina
CTE – Cadeia transportadora de elétrons
CPTII – Carnitina palmitoil transferase 2
CK – Creatina cinase
DNA – Ácido desoxiribonucleico
DNAJC19 – Proteína translocadora de membrana mitocondrial interna
(Subunidade TIM14)
DRP1 – Proteína relacionada à dinamina 1
ERK 1/2 – Cinase extracelular regulada por sinal (isoformas 1 e 2)
FALDH – Desidrogenase de aldeído graxo
G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase
GCL – Glutamato cisteína ligase
GPx – Glutaciona peroxidase
GR – Glutaciona redutase
GSH – Glutaciona reduzida
GSSG – Glutaciona oxidada
GST – Glutaciona S-transferase
HNE – 4-Hidroxinonenal
HO-1 – Heme oxigenase 1
HL – 3-Hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A liase
HMGA – Acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica
HMG – Ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico
HMG-CoA – 3-Hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A
JNK – c-Jun terminal-NH₂ cinase
MGA – Ácido 3-metilglutárico
MGT – Ácido 3-metilglutacônico
MGTA – Acidúria 3-metilglutacônica

MDH – Malato desidrogenase
MLCL – Monolisocardiopina
MFN1 – Mitofusina 1
MAPKs – Proteínas cinases ativadas por mitógeno
NADP⁺ – β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, oxidado
NADPH – β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, reduzido
NAD⁺ – β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo, oxidado
NADH – β-Nicotinamida adenina dinucleotídeo, reduzido
NT-PGC-1α – Co-ativador de receptor ativado por proliferador de peroxissomo
de *splicing alternativo*
NRF1 – Fator respiratório nuclear 1
Nrf2 – Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
OPA3 – Proteína de atrofia óptica 3
PGC1α – Co-ativador de receptor ativado por proliferador de peroxissomo alfa
PPAR – Receptor ativado por proliferador de peroxissomo
PGK1 – Fosfoglicerato cinase 1
P38 – Proteína ativada por mitógeno p38 cinase
PI3K – Fosfatidilinositol cinase 3
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RYR1 – Receptor de rianodina 1
SOD – Superóxido dismutase
SIRT – Sirtuína
SDH – Succinato desidrogenase
SERAC-1 – Proteína 1 contendo sítio ativo de serina
SNC – Sistema nervoso central
SULC – Succinil-CoA ligase
TMEM70 – Proteína transmembrana 70
TLCL – Tetralinoleilcardiolipina
TAU – Proteína associada aos microtubulos † isoforma 4
TFAM – Fator de transcrição mitocondrial A
UV – Ultravioleta

I.1 INTRODUÇÃO

I.1.1 Erros Inatos do Metabolismo

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi proposto em 1908 por Sir Archibald E. Garrod após observar uma série de características clínicas e bioquímicas em um grupo de indivíduos portadores de uma patologia pouco conhecidas até então. Dentre essas características, Garrod identificou que indivíduos que apresentavam elevados níveis urinários de ácido homogentísico, portadores da doença alcaptonúria, tinham parentes com a mesma doença e que, os pais dos pacientes não apresentavam os sintomas da doença (Scriver CR 2001). Além disso, foi observado que havia maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes (Scriver CR 2001). Levando em consideração conceitos descritos por Mendel, Garrod elaborou então a hipótese da existência de distúrbios genéticos de herança autossômica recessiva nestes indivíduos (Scriver CR 2001). Somado a isso, ele ainda propôs que o aumento das concentrações urinárias do ácido homogentísico estaria relacionado com a alteração de uma proteína (enzima ou não) presente na rota de degradação do aminoácido tirosina, visto que uma dos intermediários dessa rota é o ácido homogentísico (Scriver CR 2001). Desde então, os EIM têm sido cada vez mais estudados e melhor descritos (Saudubray JM e Garcia-Cazorla A 2018).

Os EIM são individualmente raros, porém, quando agrupados, atingem um número expressivo de indivíduos afetados em todo a mundo (Saudubray JM e Garcia-Cazorla A 2018). Até 2018 já haviam sido descritos mais de 750 doenças consideradas EIM (Saudubray JM e Garcia-Cazorla A 2018). Na clinica, estes distúrbios foram recentemente classificados em duas grandes

categorias: na categoria 1 foram incluídos os EIM que envolvem um único sistema fisiológico funcional (por exemplo, o sistema endócrino, imune, cardiovascular, etc.), ou afetam somente um órgão ou sistema anatômico (por exemplo, túbulos renais, eritrócitos, válvulas cardíacas ou fígado); na categoria 2 foram incluídos os distúrbios nos quais a alteração bioquímica afeta uma via metabólica comum a um grande número de células ou órgãos (por exemplo, doenças lisossomais ou mitocondriais) ou alguma via metabólica restrita a um órgão, mas que resulta em consequências sistêmicas (por exemplo, distúrbios no ciclo da ureia que resultam em hiperamonemia e distúrbios na glicogenólise hepática que acarretam hipoglicemia) (Saudubray JM e Garcia-Cazorla A 2018).

Os pacientes portadores de EIM da categoria 2 apresentam sintomatologia variada; assim, eles são subdivididos em outros 3 grupos para facilitar o diagnóstico: o grupo 1 inclui doenças do metabolismo intermediário que afetam pequenas moléculas, como a fenilcetonúria, tirosinemia e doença da urina do xarope de bordo; no grupo 2 foram incluídas as doenças envolvendo o metabolismo energético primário, tais como alterações no transportador de piruvato, na atividade da piruvato carboxilase ou outras enzimas do metabolismo energético primário; e no grupo 3 estão as doenças envolvendo moléculas complexas, que podem afetar os processos de síntese, processamento, controle de qualidade e catabolismo de moléculas complexas (Saudubray JM e Garcia-Cazorla A 2018).

I.1. 2 Acidúria 3-Metilglutacônica

Um considerável número de EIM que resultam em aumento de ácido 3-metilglutacônico (MGT) e MGA tem sido identificado, principalmente nas duas últimas décadas (Wortmann SB et al. 2013a). Esses distúrbios estão incluídos no grupo 2 da categoria 2, de acordo com a classificação descrita no tópico anterior. Em grande parte deles, o acúmulo de MGT e MGA é considerado apenas um fator para confirmação do diagnóstico de uma determinada doença, sendo que os níveis urinários destes ácidos encontrados nos pacientes atingem em torno de 40mmol/mol de creatinina (Wortmann SB et al. 2013a). As chamadas acidúrias 3-metilglutacônicas (MGTA) consistem em um grupo de doenças que são caracterizadas pelo elevado acúmulo tecidual e excreção urinária de diferentes ácidos orgânicos, mas principalmente MGT e MGA. Já foi reportado que nessas doenças os níveis urinários desses ácidos podem passar de 1.000mmol/mol de creatinina (Wortmann SB et al. 2012; Wortmann SB et al. 2013a). Nesta tese, abordamos o estudo dos 5 principais tipos de MGTA (do tipo I ao tipo V). Deve ser salientado aqui que as MGTAs do tipo VI e VII não serão abordadas, uma vez que ainda não estão bem elucidadas na literatura.

I.1.3 MGTA do tipo I

A MGTA do tipo I (MGTAI), também chamada de MGTA primária, é um erro inato do metabolismo de caráter autossômico recessivo causado pela deficiência isolada da enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase (EC 4.2.1.18), com prevalência em torno de <1/ 1 000 000 de indivíduos nascidos vivos com em torno de 40 casos reportados na literatura até 2020 (Bizjak N et al. 2020; Wortmann SB et al. 2013b). Essa enzima mitocondrial é necessária para a conversão de 3-metilglutaconil-CoA em 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA, reação da

rota do catabolismo da leucina e também da cetogênese (Figura 1) (Ijlst L et al. 2002).

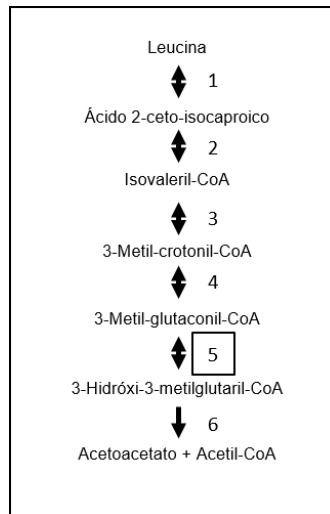


Figura 1. Representação ilustrativa da via de degradação da leucina. Os números representam as enzimas envolvidas em cada etapa da via: 1. Transaminase de aminoácido de cadeia ramificada; 2. Complexo desidrogenase de 2-cetoácidos de cadeia ramificada; 3. Isovaleril-CoA desidrogenase; 4. Metil-crotonil-CoA carboxilase; 5. 3-Metil-glutaconil-CoA hidratase; 6. 3-Hidróxi-3-metil-glutaril-CoA liase. Adaptado de Ijlst et al. (2002).

A enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase é codificada pelo gene *AUH* localizado na região q22.3 do cromossomo 9 (Tavasoli AR et al. 2017). A literatura mostra, no mínimo, 12 mutações diferentes em pacientes portadores da MGTAI, sendo que a maioria destes pacientes apresentam mutações de troca de sentido e com perda de sentido (do inglês *missense* e *nonsense mutation*, respectivamente) (Tavasoli AR et al. 2017). Esses dois tipos de mutações podem resultar em alterações importantes na atividade da 3-metilglutaconil-CoA hidratase, resultando em diferentes fenótipos patogênicos da doença (Cox MM et al. 2009; Tavasoli AR et al. 2017).

O quadro clínico da MGTAI é geralmente heterogêneo e inespecífico e inclui retardo psicomotor, convulsões, distonia, dificuldades na fala e atraso intelectual, além de hipoglicemia e acidose metabólica (Ly TB et al. 2003; Vockley J et al. 2014). Outros sintomas geralmente encontrados incluem

refluxo gastroesofágico, alterações no comportamento com irritabilidade excessiva e mudanças de humor repentinas; além disso, em um caso isolado o paciente apresentou um quadro febril (Illsinger S et al. 2004; Vockley J et al. 2014). Esses sintomas podem ter início nos primeiros anos de vida, na adolescência ou mesmo na vida adulta e variam em intensidade, podendo ser mínima ou gravemente debilitantes, além de progressivos (Ly TB et al. 2003; Vockley J et al. 2014).

Em alguns casos, exames de imagem evidenciam leucoencefalopatia e anormalidades nos núcleos da base (Vockley J et al. 2014). Ainda, em exames bioquímicos avançados, é possível verificar elevados níveis de MGT e MGA nos líquidos biológicos dos pacientes (Wortmann SB et al. 2012). Tais concentrações podem aumentar ainda mais em situações de catabolismo acelerado, como infecções e jejum, durante as quais há o aumento da proteólise (Vockley J et al. 2014).

O diagnóstico é comumente realizado pela identificação de ácidos orgânicos na urina, geralmente por cromatografia gasosa seguida de espectrometria de massas, acompanhada da determinação da atividade da enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase em fibroblastos ou linfócitos (Ijlst L et al. 2002; Ly TB et al. 2003). Já o tratamento é bastante limitado e consiste na suplementação com L-carnitina e restrição de proteínas e leucina na dieta (Arbelaez A et al. 1999; Ly TB et al. 2003).

I.1.4 MGTA do tipo II

A MGTA do tipo II (MGTAII) é uma doença que acomete principalmente crianças, porém existem casos de diagnóstico tardio em indivíduos acima dos 30 anos de idade que passaram por vários especialistas até receber o

diagnóstico correto (Seitz A et al. 2020). A MGTAll, também conhecida como Síndrome de Barth, é uma síndrome multisintomática causada por mutações no gene *TAZ* (Ikon N e Ryan RO 2017), que está na região q28 do cromossomo X, e que codifica uma acil-transferase denominada tafazina (Hastings R et al. 2009). A prevalência está estimada em 1/454.000 e incidência em 1/140.000 (Sudoeste de Inglaterra, sul de Gales) a 1/300.000 - 1/400.000 nascidos-vivos (EUA) (Clarke SL et al. 2013). A tafazina atua especificamente no remodelamento da cardiolipina (CL). A CL é inicialmente sintetizada em uma forma imatura rica em lipídios saturados, a qual sofre deacilação por uma fosfolipase gerando monolisocardiopina (MLCL). A tafazina então adiciona outros lipídeos até formar a CL-funcional (tetralinoleilcardiolipina-TLCL) (Figura 2). Desta forma, pacientes com mutações no gene *TAZ* apresentam aumento na concentração de MLCL e diminuição da concentração de CL do tipo TLCL e também no *pool* total de CL (Cole LK et al. 2018; Ferreira C et al. 1993b; He Q 2010).

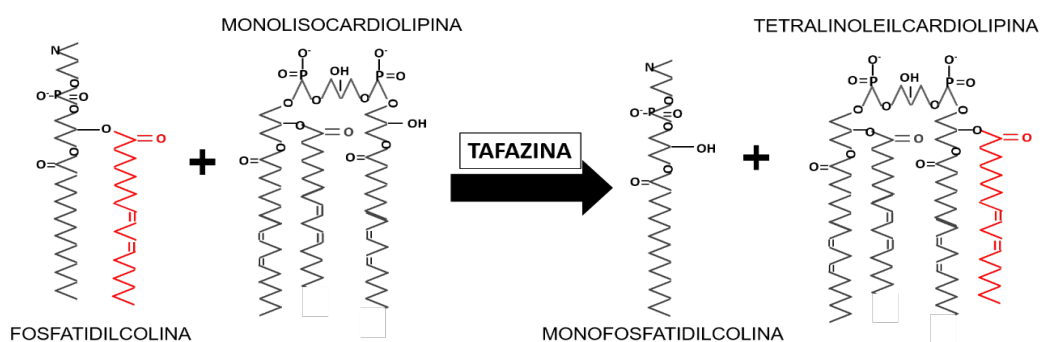


Figura 2. Representação ilustrativa do remodelamento da cardiolipina. A figura demonstra a transferência de um grupo acil da fosfatidilcolina para a monolisocardiopina resultando em dois produtos: a monofosfatidilcolina e a tetralinoleilcardiolipina (forma funcional do lipídio). Adaptado de Ikon e Ryan (2017).

A CL é um fosfolípido de membrana mitocondrial que está presente principalmente na membrana interna da mitocôndria e que possui características físico-químicas diferenciadas que favorecem sua habilidade de interagir com proteínas ao seu redor (Ikon N e Ryan RO 2017). De fato, na ausência de CL, a fosforilação oxidativa pode estar prejudicada, resultando em déficit energético (Ikon N e Ryan RO 2017; Patil VA et al. 2013). Embora as MGTA do tipo II, III, IV e V sejam consideradas MGTA secundárias, uma vez que as reações que resultam na produção aumentada de MGT e MGA ainda não estão bem estabelecidas, alguns autores salientam que a possível inibição do ciclo de Krebs e outras vias dependentes de NAD⁺ resultaria em acúmulo de intermediários do metabolismo energético como acetil-CoA e propionil-CoA, ativando vias metabólicas alternativas que resultariam na produção de MGT e MGA nestes pacientes (Ikon N e Ryan RO 2017).

O quadro clínico da MGTAll é multivariado e caracterizado por cardiomiopatia fetal e/ou pós natal, intolerância ao exercício, fraqueza muscular, neutropenia associada a infecções recorrentes, baixa estatura, hipocolesterolemia, acidose láctica, problemas motores e de alimentação e, em alguns casos, esteatose hepática (Fatica EM et al. 2019; Imai-Okazaki A et al. 2018; Steward CG et al. 2019). Contudo, deve ser enfatizado que grande parte dos pacientes com MGTAll apresentam cardiomiopatias, principalmente cardiomiopatia dilatada ou a não-compactação ventricular esquerda que, por vezes, culminam em grave insuficiência cardíaca e até mesmo na necessidade de transplante cardíaco (Karkucinska-Wieckowska A et al. 2013). Estas alterações cardíacas vistas nos pacientes com MGTAll muitas vezes levam os indivíduos a óbito (Ferreira C et al. 1993a). Juntamente com as

cardiomiopatias, um dos sintomas mais importantes vistos nos pacientes é a neutropenia sem etiologia conhecida (Steward CG et al. 2019). A neutropenia é uma condição potencialmente fatal e muito perigosa que resulta em elevada vulnerabilidade ao contato com patógenos e recorrentes infecções sintomáticas (Spoor J et al. 2019). É relativamente comum que os pacientes desenvolvam pneumonia, insuficiência renal e febre acompanhada por choque séptico quando acometidos por alguma infecção, podendo até mesmo causar a morte do paciente (Steward CG et al. 2019).

O tratamento tem sido baseado no controle dos sintomas com tratamentos paliativos como a administração de L-carnitina e administração de amido de milho noturno (Reynolds S 2015). O diagnóstico da MGTAI é geralmente realizado por quantificação de ácidos orgânicos na urina e análise da razão MLCL/CL-total nas células sanguíneas, ambos por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Ferreira C et al. 1993a; Imai-Okazaki A et al. 2018). Entretanto, para confirmação da doença, ainda é indicado o sequenciamento direto do gene *TAZ* (Ferreira C et al. 1993a; Imai-Okazaki A et al. 2018).

I.1.5 MGTA do tipo III

A MGTA do tipo III (MGTAI), também chamada de Síndrome da Atrofia Óptica de Costeff, é uma doença hereditária de caráter autossômico recessivo associado a mutações no gene *OPA3* (do inglês *Optic Atrophy 3*), que está presente na região q13.2-q13.3 do cromossomo 19 (Anikster Y et al. 2001; Sofer S et al. 2015). A prevalência mundial desta doença é desconhecida, entretanto dados sugerem que é considerada elevada na população judaica iraquiana, sendo em torno de 1:10.000 nascidos vivos (Anikster Y et al. 2001;

Elpeleg ON et al. 1994). As principais mutações vistas no *OPA3* são: mutações na junção de *splicing*, mutações *in-frame* (deleção ou inserção de 3 bases) e mutações sem sentido (Pei W et al. 2010).

A função da proteína *OPA3* ainda não está bem estabelecida (Anikster Y et al. 2001; Nystuen A et al. 1997), porém estudos já observaram que esta proteína está presente em grande quantidade no córtex cerebral, medula, cerebelo e no lobo frontal quando comparado com outras regiões cerebrais (Sofer S et al. 2015). Estudos sugerem que a *OPA3* presente na membrana mitocondrial interna estabiliza as proteínas da cadeia transportadora de elétrons (CTE), ao passo que a *OPA3* defeituosa, quando presente na membrana mitocondrial externa, está relacionada a aumento na fragmentação mitocondrial, além de tornar as células mais suscetíveis à apoptose (Ryu SW et al. 2010; Saunders C et al. 2015; Sofer S et al. 2015).

Na *MGT* também há o aumento de *MGT* e *MGA*, porém sua origem ainda não está confirmada. Contudo, segundo Pei et al. (2010), o aumento da produção de ácidos orgânicos poderia ter origem tanto mitocondrial quanto citosólica (Pei W et al. 2010). Neste trabalho, foi sugerido que qualquer alteração no metabolismo do colesterol poderia resultar no desvio do intermediário dimetil-alil-pirofosfato e ativar sua conversão a 3-metilcrotonato (*Popjak Shunt*) que, por sua vez, entra na mitocôndria e resulta na ativação de vias metabólicas alternativas que podem produzir *MGT* e *MGA* por um mecanismo ainda não elucidado (Figura 3) (Anikster Y 1993; Brady PS et al. 1982; Edmond J e Popjak G 1974; Pei W et al. 2010). Além disso, quando ocorre a inibição de *HMG-CoA* redutase por sinvastatina, também ocorre a conversão de *HMG-CoA* a 3-metilglutaconato, que seguiria o mesmo caminho

para produção de MGT e MGA (Figura 3) (Pei W et al. 2010). Também foi sugerido que uma das funções da OPA3 é favorecer o direcionamento de intermediários do metabolismo citosólico de colesterol para a mitocôndria e controlar os níveis de MGT pela atividade de enzimas do metabolismo mitocondrial da leucina (Figura 3) (Pei W et al. 2010). Contudo, são necessários mais estudos para confirmação destas hipóteses.

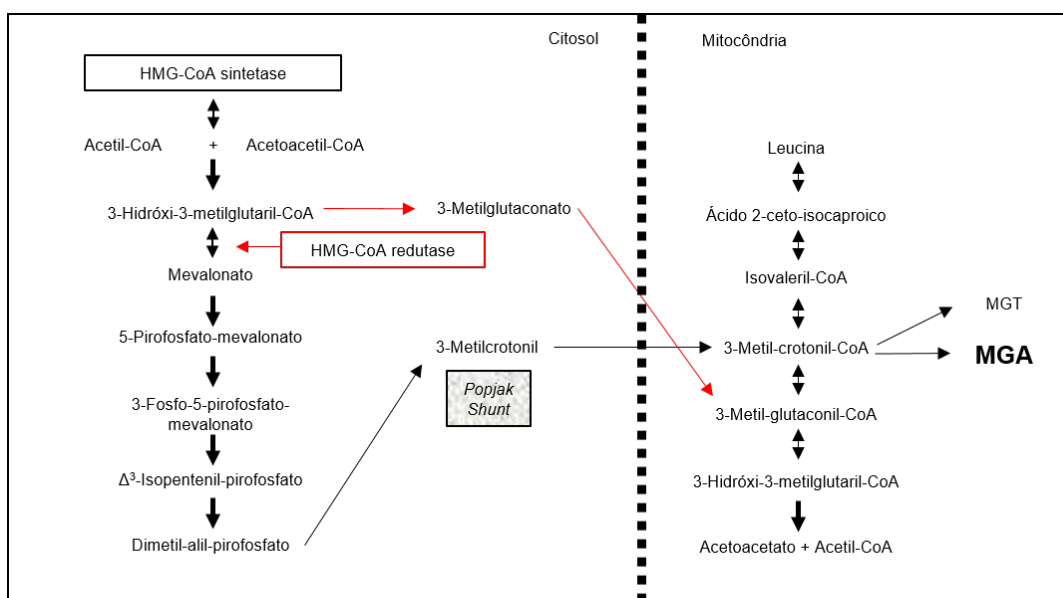


Figura 3. Representação ilustrativa das vias de produção de MGT e MGA sugeridas na MGTAlII. A figura demonstra em vermelho o deslocamento de intermediários do metabolismo do colesterol para a produção de 3-metilglutaconato em caso de inibição da HMG-CoA redutase. No quadro menor é possível ver o *Pupjak Shunt* que resultaria no deslocamento de dimetil-alil-pirofosfato para produção de 3-metilcrotonil. No lado direito da figura, é possível identificar a entrada dos ácidos orgânicos produzidos para a mitocôndria e sua alocação no metabolismo da leucina. Adaptado de Pei et al. (2010) e Anikster et al. (2006).

Os pacientes com MGTA III apresentam um quadro clínico importante associado à atrofia óptica bilateral infantil, com moderada ataxia cerebelar e déficit cognitivo com raros casos de epilepsia (Anikster Y 1993; Carmi N et al. 2015; Gunay-Aygun M 2005; Vockley J et al. 2014). A atrofia do nervo óptico (AO) é a característica clínica que diferencia outras doenças com alterações em movimentos extrapiramidais da MGTAlII. A AO é caracterizada como uma perda variável dos axônios do nervo óptico seguida por uma variável

deterioração da acuidade visual (Chen AT et al. 2019). A maioria dos pacientes também apresenta alterações em movimentos extrapiramidais resultando em um quadro grave de coreia (*chorea disease*) (Carmi N et al. 2015). Embora o fenótipo desta doença resulte em um quadro clínico incapacitante, ela não parece alterar a expectativa de vida de seus pacientes (Carmi N et al. 2015).

A suspeita de MGTAIII geralmente ocorre devido a recorrentes alterações visuais e histórico familiar de doença oftalmológica hereditária. São feitos testes para verificar os níveis de MGT na urina do paciente seguidos de exames genéticos no gene *OPA3* para confirmação da alteração genética (Anikster Y 1993; Wortmann SB et al. 2013a).

A MGTAIII é tratada de forma paliativa para melhora dos sintomas. É feito um acompanhamento oftalmológico e tratamento fisioterápico para ajuste do controle motor e prevenção de câimbras que apresenta boa resposta quando acompanhado do uso de coenzima Q e terapia ocupacional (al Aqeel A et al. 1994; Anikster Y 1993).

I.1.6 MGTA do tipo IV

A MGTA do tipo IV (MGTAIV), também chamada de MGTA não-classificada, é assim denominada quando os outros tipos de MGTA já foram excluídos pelos testes de identificação (Ijlst L et al. 2002; Ly TB et al. 2003). Sem origem definida e com prevalência desconhecida, a MGTA IV apresenta um quadro clínico caracterizado por convulsões, dano neurológico progressivo, atraso no desenvolvimento geral, anormalidades no tônus muscular e alterações na retina dos pacientes que podem resultar em catarata, sendo que as alterações do SNC são evidenciadas nos primeiros anos de vida (Broide E et al. 1997). Além disso, é possível verificar a presença de cardiomiopatia

hipertrófica, disfunções hepáticas, hipoglicemia e déficit na evolução ponderal (Broide E et al. 1997).

Como a MGTAIV apresenta heterogeneidade no fenótipo clínico, um grande espectro de genes pode estar envolvidos (Wortmann SB et al. 2009). Na tentativa de identificar e caracterizar subgrupos pertencentes, pesquisadores diferenciaram quatro pequenos grupos considerando o quadro clínico e a mutação genética (Wortmann SB et al. 2009). No primeiro subgrupo, chamado de subgrupo encefalopático, os pacientes desenvolvem encefalopatia e têm mutações no gene *SUCLA2* que codifica para a subunidade beta da enzima *SULC* (do inglês *succinate-CoA ligase*) (El-Hattab AW et al. 2017a; Wortmann SB et al. 2009). A atividade da *SULC* ocorre principalmente em momentos de elevada demanda energética, como no desenvolvimento do sistema nervoso, e sua falta resulta em alterações do SNC (El-Hattab AW et al. 2017a; Wortmann SB et al. 2009). O segundo subgrupo foi chamado de hepatocerebral, onde as características patogênicas integram alterações hepáticas que afetam o cérebro. Estas alterações são geralmente associadas com a deficiência do complexo I e importantes depleções de DNA mitocondrial (Wortmann SB et al. 2009). No terceiro subgrupo foram alocados os pacientes com alterações cardíacas (subgrupo das cardiomiopatias), os quais têm mutações no gene *TMEM70* que codifica para uma proteína transmembrana que auxilia na biogênese da ATP-sintase (Stojanovic V e Doronjski A 2013; Wortmann SB et al. 2009). No quarto subgrupo foram incluídas condições com miopatia grave, como a causada por mutações no gene *RYR1* (do inglês *ryanodine receptor type 1*) (Wortmann SB et al. 2009). Além disso, Sarig e colaboradores mostraram que pacientes com MGTA IV também podem

apresentar mutações no gene *SERAC1* (quinto subgrupo), que codifica para uma proteína essencial para o remodelamento de fosfolípidios e o transporte intracelular de colesterol (Sarig O et al. 2013). Contudo, as variações nestes genes envolvidos na MGTAIV e o pequeno número de pacientes impede que a classificação seja assertiva (Stojanovic V e Doronjski A 2013).

Devido à enorme diversidade das possíveis alterações genéticas e sintomas, o desenvolvimento de um tratamento específico é difícil. Assim, pouco se sabe sobre o tratamento específico para a MGTA IV, porém, dependendo do fenótipo do paciente, pode ser realizada a administração de coenzima Q10, além de tiamina e biotina (Fassone E et al. 2013; Stojanovic V e Doronjski A 2013; Yahalom G et al. 2014).

I.1.7 MGTA do tipo V

A MGTA do tipo V (MGTAV) também é uma condição de caráter autossômico recessivo causada por mutações de deleção no gene *DNAJC19* que está envolvido em processos de translocação de proteínas através da membrana interna da mitocôndria (Davey KM et al. 2006; Sarig O et al. 2013). Portanto, a deficiência desta proteína impede a importação de proteínas para a matriz da mitocôndria resultando em disfunção mitocondrial (Sarig O et al. 2013). Até o momento, todos os casos de MGTAV relatados envolvem indivíduos da população de descendentes de anabatistas, uma população que frequentemente pratica a endogamia e que está situada na região das grandes planícies do Canadá e ao norte dos EUA (Davey KM et al. 2006).

Os pacientes apresentam comumente cardiomiopatia associada a defeitos de condução de impulso nervoso, ataxia cerebral não-progressiva, disgenesia testicular, esteatose hepática, anemia e déficit de crescimento

(Sarig O et al. 2013; Wortmann SB et al. 2013a). No início dos sintomas, a MGTAV pode ser confundida com a MGTAll, pois os pacientes também apresentam níveis aumentados de MGT e MGA na urina e cardiomiopatia (Davey KM et al. 2006). Entretanto, ainda não foram relatados pacientes com MGTAV apresentando miopatia esquelética, alterações no sistema imune e nem mesmo herança ligada ao X e, desta forma, os achados clínicos podem ser úteis para diferenciar a MGTAll da tipo V (Davey KM et al. 2006).

O tratamento consiste em controlar os sintomas mais debilitantes com suplementação de ferro para pacientes anêmicos, uso de bloqueadores adrenérgicos, diuréticos e anticoagulantes para casos de cardiomiopatias e, como adjuvantes, administração de carnitina e ubiquinona (Ojala T et al. 2012).

I.1.8 Acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica

A acidúria 3-hidróxi-3-metilglutárica (HMGA) é uma doença de caráter autossômico recessivo causada pela deficiência da enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA-liase (HL) (da Rosa MS et al. 2013). Dados epidemiológicos sugerem uma baixa incidência dessa doença nos EUA, Taiwan e China continental, a qual foi estimada em menos de 1 / 1.000.000 nascidos vivos (Santarelli F et al. 2013); no entanto, um número maior de casos têm sido descrito na Arábia Saudita, Portugal e Espanha (Al-Sayed M et al. 2006; Cardoso ML et al. 2004), estes indivíduos também apresentam elevação dos níveis de MGT e MGA (Vargas CR et al. 2008). HL atua na última etapa do catabolismo do aminoácido leucina e da síntese de corpos cetônicos, sendo responsável pela clivagem de 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) a acetoacetato e acetil-CoA (Figura 3) (da Rosa MS et al. 2016).

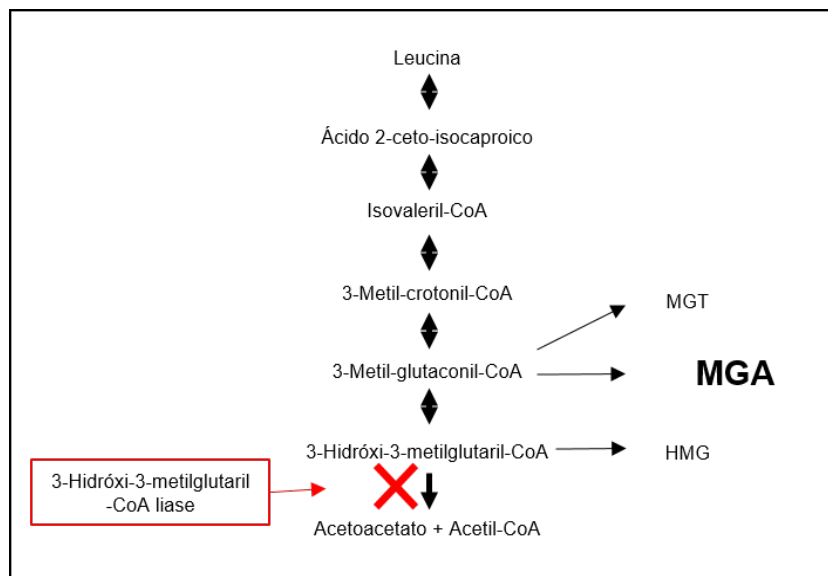


Figura 4. Representação ilustrativa do bloqueio da via do metabolismo de leucina e formação de corpos cetônicos. A figura mostra a formação dos ácidos orgânicos ácido 3-metilglutacônico (MGT), ácido 3-metilglutárico (MGA) e ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG). Adaptado de Sweetman e Williams (2001).

Embora o principal ácido orgânico acumulado nos pacientes com HMGA seja o ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG), os pacientes também apresentam elevada produção de MGT, pois a reação catalisada pela enzima 3-metilglutaconil-CoA hidratase é facilmente revertida quando ocorre o acúmulo de HMG-CoA. Ainda, por vias metabólicas alternativas, o MGT pode ser hidrogenado e formar MGA (Figura 3) (Bonafe L et al. 2000; Sweetman L e Williams J 2001). A HMGA é caracterizada geralmente pelo surgimento dos primeiros sintomas no período neonatal e em torno de 20% dos casos ela tem se mostrado fatal (Sweetman L e Williams J 2001).

A sintomatologia desta doença é vasta, mas está principalmente associada a alterações no SNC, tais como macrocefalia e microcefalia, com o envolvimento de importantes regiões cerebrais como os núcleos caudado, denteado, globo pálido, bem como do trato corticoespinal (Yalcinkaya C et al. 1999; Yilmaz Y et al. 2006). Juntamente com as alterações neuropatológicas, também é possível observar hepatomegalia, pancreatite aguda e alterações

cardiovasculares (Yalcinkaya C et al. 1999; Yilmaz Y et al. 2006; Zafeiriou DI et al. 2007). Normalmente, o pior cenário do ponto de vista clínico surge durante períodos de descompensação metabólica, que são caracterizados por catabolismo acelerado quando os pacientes ficam em jejum prolongado, praticam exercícios ou durante infecções. Nessas situações, os pacientes comumente apresentam letargia, hipotonia, vômitos, diarreia, desidratação, hipotermia e apneia que pode progredir ao coma e à morte (Funghini S et al. 2001; Pospisilova E et al. 2003; Sweetman L e Williams J 2001). A suspeita de HMGA é sugerida quando o paciente apresenta hipoglicemia não cetótica. Contudo, para o diagnóstico correto é necessária a quantificação de ácidos orgânicos na urina e a determinação da atividade de HL em leucócitos, fibroblastos ou plaquetas (Sweetman L e Williams J 2001).

O tratamento de pacientes com HMGA é baseado em restrição de leucina e lipídios na alimentação, o que resulta na prevenção do acúmulo de intermediários tóxicos, bem como a concomitante administração de carnitina devido às reações de conjugação dos ácidos orgânicos com essa molécula, facilitando a excreção (Dasouki M et al. 1987).

I.1.9 Fisiopatologia

No que concerne a fisiopatologia dos EIM, os pesquisadores têm desenvolvido os mais diversos modelos experimentais para responder suas questões científicas. Muito embora os modelos genéticos estejam sendo empregados em grande escala atualmente os modelos químicos têm se mostrado muito importantes para o entendimento dos mecanismos associados a produtos metabólicos possivelmente tóxicos (da Rosa MS et al. 2013; Leipnitz G et al. 2009a).

Neste sentido, os mecanismos pelos quais as alterações genéticas nas MGTA e HMGA resultam em seus fenótipos patogênicos ainda não estão claros. No entanto, trabalhos com modelos experimentais químicos têm sugerido que o truncamento de rotas metabólicas ocasionando acúmulo de intermediários pode resultar em toxicidade (da Rosa MS et al. 2013; Leipnitz G et al. 2009a). Como citado anteriormente, a maioria das mutações genéticas vistas nos indivíduos com MGTA e HMGA implicam em alterações mitocondriais (Aoyama Y et al. 2015; Cupo RR e Shorter J 2020; Gonzalez IL 2005; Huizing M et al. 2010; Lin WD et al. 2009; Pronicka E et al. 2016; Ruesch S et al. 1996; Snanoudj S et al. 2019; Tort F et al. 2019). Neste sentido, deve ser destacado que a mitocôndria é considerada a principal fonte de espécies reativas de oxigênio nas células (Halliwell B e Gutteridge JM 2015). Ainda, estudos *ex vivo* e *in vitro* têm mostrado que diferentes metabólitos acumulados tanto nas MGTA quanto na HMGA causam estresse oxidativo em diferentes estruturas cerebrais e fígado de ratos por induzir dano oxidativo lipídico e proteico, além de alterar defesas antioxidantes (da Rosa MS et al. 2013; Fernandes CG et al. 2013; Leipnitz G et al. 2009a). Outros trabalhos, ainda têm evidenciado, que o MGA consegue atravessar a barreira hematoencefálica e que alterações no estado redox ocasionado pela administração de MGA têm potencial para causar dano oxidativo ao DNA em tecido cerebral (estriado) de ratos (da Rosa MS et al. 2013; da Rosa MS et al. 2015). Desta forma, o estresse oxidativo parece estar associado tanto ao dano ao SNC quanto ao quadro de hepatopatia presente nos pacientes. Entretanto, os mecanismos exatos associados às anormalidades cerebrais potencialmente patogênicas causadas pela toxicidade de MGA ainda não estão bem estabelecidos.

Homeostase Redox

I.1. 9. 1 Espécies Reativas e Radicais Livres

Espécies reativas são moléculas ou átomos que apresentam instabilidade eletrônica e maior capacidade de reação com outras moléculas ou outros átomos, e que comumente apresentam elétrons emparelhados em seus orbitais. No caso dos radicais livres, por definição, essas moléculas obrigatoriamente contêm um ou mais elétrons desemparelhados em seu último orbital, o que aumenta a sua reatividade, pois eles tendem a buscar o pareamento eletrônico e muitas vezes oxidam outras moléculas (Halliwell B 2006). Um radical livre muito importante oriundo do oxigênio mitocondrial que podemos salientar é o superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Para a formação do $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial, o O_2 livre mitocondrial recebe um único elétron que escapou da CTE, assim, se tornando altamente reativo com um elétron desemparelhado em sua orbita (Cheeseman KH e Slater TF 1993).

Os principais representantes das espécies reativas no organismo humano podem ter caráter de radical ou não-radical, tais como oxigênio singlete ($1/2 O_2$), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o não-radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Pisoschi AM e Pop A 2015). Também é possível encontrar espécies formadas a partir de nitrogênio, ferro, enxofre e cobre (Pisoschi AM e Pop A 2015; Zhang J et al. 2016).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido objeto de intenso estudo. Sob condições fisiológicas normais os níveis de ROS permanecem em um estado de equilíbrio dinâmico entre capacidade de produção e de

detoxificação destas moléculas (Zhang J et al. 2016). Quando este equilíbrio é mantido, essas moléculas reativas são importantes para que a sinalização celular e outros processos homeostáticos fisiológicos ocorram de maneira eficiente (Pastor N et al. 2000). No entanto, quando a capacidade de manter a produção de ROS em níveis basais é superada e mantida por muito tempo, pode haver deterioração de sistemas e tecidos (Halliwell B 2006; Halliwell B e Gutteridge JM 2015).

I.1. 9. 2 Defesas antioxidantes

Antioxidantes biológicos são moléculas que mesmo em baixas concentrações em comparação a uma determinada molécula oxidável são capazes de prevenir ou retardar a oxidação desta molécula (Pisoschi AM e Pop A 2015). Em seres humanos é possível identificar dois tipos de defesas antioxidantes: as enzimáticas e as não-enzimáticas (Pisoschi AM e Pop A 2015). O sistema de defesa antioxidante celular compreende diversas enzimas importantes que atuam diretamente sobre os moléculas oxidantes, dentre as quais podemos citar algumas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx), e enzimas que atuam indiretamente como glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Pisoschi AM e Pop A 2015). Somado a isso, também há a presença de defesas antioxidantes não enzimáticas como GSH e várias proteínas que impedem reações oxidativas, tais como transferrina, albumina e ferritina (Pisoschi AM e Pop A 2015). Além disso, moléculas contidas nos alimentos também podem atuar diretamente sobre radicais livres. Como exemplos, temos as vitaminas C e E, carotenoides e fenois (Pisoschi AM e Pop A 2015).

Todas estas defesas atuam em conjunto resultando em um equilíbrio dinâmico entre a produção de espécies reativas e sua eliminação do sistema (Pisoschi AM e Pop A 2015). Neste sentido, quando ocorrem alterações nestes sistemas de defesa ou produção exacerbada de moléculas oxidativas que não conseguem ser neutralizados pelo sistema antioxidante, se desenvolve um quadro de estresse oxidativo (Pisoschi AM e Pop A 2015).

I.1. 9. 3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio da homeostase redox devido a um aumento exacerbado nos níveis de ROS e/ou diminuição das defesas antioxidantes. Muitas vezes, o quadro de estresse oxidativo é necessário para ativação de importantes funções celulares e mesmo para o aumento das próprias defesas antioxidantes (Pisoschi AM e Pop A 2015). Desta forma, espécies reativas e radicais livres são produzidos constantemente pelo metabolismo normal das células humanas (Kudryavtseva AV et al. 2016; Pisoschi AM e Pop A 2015). A principal fonte de espécies reativas e radicais livres do organismo humano são as mitocôndrias dos tecidos, mais especificamente a CTE, porém, existem outras dezenas de enzimas que também produzem ROS (Kudryavtseva AV et al. 2016).

O estresse oxidativo tem sido associado a várias doenças, tais como a doença Alzheimer, doença de Parkinson e diferentes tipos de câncer, dentre outras (Ben-Sahra I et al. 2013; Dineley KT et al. 2001; Jazvinscak Jembrek M et al. 2018; Yang Y et al. 2016) Estudos têm salientado várias hipóteses associadas a dano celular causado por ROS para tentar explicar os mecanismos associados a essas doenças. Kudryavtseva e colaboradores

(2016) afirmam que os radicais livres produzidos em excesso podem ocasionar danos celulares relacionados a três principais tipos de biomoléculas: a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e a oxidação de DNA e RNAs (Kudryavtseva AV et al. 2016).

Os principais agentes oxidantes que iniciam a peroxidação lipídica são o OH^\bullet e o radical peridroxil (HO_2^\bullet) (Kudryavtseva AV et al. 2016). Estes radicais livres roubam elétrons de lipídios do *pool* de lipídios livres e também de lipídios das membranas das células e de organelas e subsequentemente produzem lipídios reativos que podem perpetuar uma cascata de deterioração de lipídios que pode resultar em morte celular (Su LJ et al. 2019). Além disso, produtos de peroxidação lipídica como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE) podem reagir com proteínas do metabolismo intermediário como a PGK-1 (fosfoglicerato cinase-1) e MDH (malato desidrogenase) e bloquear rotas metabólicas (Kudryavtseva AV et al. 2016).

No que se refere a danos ao DNA, é importante salientar que nosso DNA genômico, mesmo sem a perpetuação do quadro de estresse oxidativo, está sempre sofrendo danos oxidativos em menor grau mesmo em estados de equilíbrio redox (Cooke MS et al. 2003). Da mesma forma, isso acontece com o DNA mitocondrial, o qual está diretamente exposto aos ROS produzidos na CTE (Kudryavtseva AV et al. 2016). Porém, esta dinâmica parece fazer parte do processo natural de envelhecimento e está claramente relacionada ao desenvolvimento de doenças relacionadas à idade, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Cooke MS et al. 2003; Kudryavtseva AV et al. 2016).

Assim, como discutido no capítulo I.1.8, os modelos de MGTA e HMGA aqui apresentados compartilham alterações importantes que resultam em um quadro de estresse oxidativo. Apesar deste mecanismo contribuir para o fenótipo dos pacientes, ainda não existem tratamentos específicos para estas doenças genéticas, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos. Neste contexto, atualmente está em curso um estudo clínico (chamado de Cardioman-ISRCTN58006579) para verificar a segurança e os efeitos da administração de bezafibrato (BEZ) para o tratamento da MGTAII. No entanto, os mecanismos pelos quais este medicamento pode gerar efeitos positivos nas MGTA ainda não estão totalmente estabelecidos na literatura.

I. 2 Função Mitocondrial

As mitocôndrias possuem diferentes funções celulares que são geralmente englobadas no termo “função mitocondrial” (Brand MD e Nicholls DG 2011). Além de sua predominante função de gerar ATP através da fosforilação oxidativa, é possível destacar sua capacidade de controle da homeostase redox, seu envolvimento em vias de apoptose, regulação dos níveis de cálcio presentes no citoplasma e na matriz mitocondrial, síntese de grupos heme e alguns hormônios, entre outras funções (Brand MD e Nicholls DG 2011; Picard M et al. 2016). Quaisquer alterações nesses processos provocam disfunção mitocondrial e frequentemente causam graves consequências em nível celular (Brand MD e Nicholls DG 2011).

Todavia, a bioenergética mitocondrial continua sendo a função mais estudada, sendo que alterações neste processo são observadas em diversas doenças, tais como câncer (Xie B et al. 2019) e desordens metabólicas (Sabbah HN 2021). A maioria dos processos funcionais do organismo

necessitam de energia na forma de ATP gerado pelas mitocôndrias, as quais sintetizam e/ou recebem metabólitos de uma gama de vias de degradação de substratos energéticos (Lehninger A et al. 2019; Smith C et al. 2007). Assim, a mitocôndria se torna o ponto de ligação entre vários caminhos metabólicos energéticos (Lehninger A et al. 2019; Smith C et al. 2007).

Na tentativa de manter a viabilidade das células, as mitocôndrias apresentam pronunciada dinâmica, respondendo a alterações em sua própria fisiologia e também a fatores externos com modificações em sua morfologia (Tilokani L et al. 2018; van der Bliëk AM et al. 2013; Westrate LM et al. 2014). Estas alterações morfológicas são parcialmente controladas por proteínas de dinâmica mitocondrial, as quais favorecem ou regulam os processos de fusão e fissão mitocondrial (Tilokani L et al. 2018; van der Bliëk AM et al. 2013; Westrate LM et al. 2014). As proteínas mitocondriais mais importantes para a fusão são as mitofusinas 1 e 2 somadas a OPA1, e em casos de fissão a proteína relacionada à dinamina 1 (DRP1) é essencial (Chan DC 2012). O balanço entre o processo de fusão e fissão mitocondrial resulta em um equilíbrio dinâmico essencial para a manutenção das funções mitocondriais (Tilokani L et al. 2018; van der Bliëk AM et al. 2013; Westrate LM et al. 2014).

Ainda é importante destacar que pelo menos parte destes processos pode ser influenciado pela biogênese mitocondrial. A biogênese mitocondrial é coordenada por mecanismos moleculares fortemente regulados pela ativação da via PGC-1 α /PPARs (co-ativador de receptor ativado por proliferador de peroxissomo alfa, receptores ativados por proliferadores de peroxissomos, respectivamente) (Jornayvaz FR e Shulman GI 2010). A ativação desta via tem induz o fator de transcrição respiratório nuclear 1 (NRF1) e 2, os quais resultam

em ativação do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) (Jornayvaz FR e Shulman GI 2010). Dessa forma, podendo atuar em conjunto com a AMPK (proteína cinase ativada por adenosina monofosfato), uma cinase sensível a alterações nos níveis energéticos celulares, essas vias moleculares resultam em biogênese mitocondrial com consequente síntese de todos os componentes necessários para melhorar a resposta mitocondrial a “desafios energéticos” ou outras situações de dano (Jornayvaz FR e Shulman GI 2010).

I. 3 Bezafibrato (BEZ)

O BEZ é um medicamento utilizado há mais de 30 anos para o tratamento de dislipidemias. Este fármaco é da classe dos fibratos (Al-Najdawi M et al. 2019) (Figura 5).

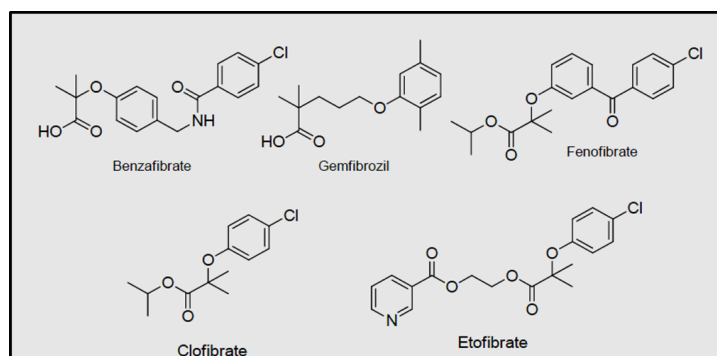


Figura 5. Representação ilustrativa da estrutura molecular dos fibratos mais utilizados no tratamento de dislipidemias. Adaptado de Al-Najdawi e colaboradores (2019).

O BEZ é considerado um pan-agonista dos PPAR- α , γ e δ , os quais são considerados fatores de transcrição chave no metabolismo de ácidos graxos e da glicose (Al-Najdawi M et al. 2019). Por esta razão, ele também tem se

mostrado importante no tratamento de diabetes tipo II (Tenenbaum A e Fisman EZ 2012) e na prevenção de alterações cardiovasculares (Goa KL et al. 1996).

A distribuição do PPAR no organismo de mamíferos é ampla, mas comumente uma isoforma é mais expressa em um tecido que no outro. Os PPAR- α são mais expressos no fígado, coração, músculo esquelético, rins e intestino, mas fracamente no cérebro (Corona JC e Duchon MR 2015). Por outro lado, o PPAR- β e δ são altamente expressos no SNC, trato gastrointestinal e placenta, e o PPAR- γ parece ser expresso na maioria dos tecidos, mas predominantemente no tecido adiposo e no SNC (Corona JC e Duchon MR 2015). Claramente, os fibratos que apresentam maior afinidade por um tipo ou tipos de PPAR podem obter ação tecido específica, o que confere a estes medicamentos um perfil importante de amplitude de administração a ser estudado.

Neste sentido, nos últimos anos pesquisadores têm mostrado que fibratos possuem características importantes para reposicionamento farmacológico para o tratamento de outras enfermidades. Tais medicamentos têm sido testados em modelos de doença de Parkinson (Corona JC e Duchon MR 2015), doença de Huntington e também em modelos de EIM, como na deficiência da sulfito oxidase, onde a administração de BEZ mostrou ativar a biogênese mitocondrial e prevenir desequilíbrio redox (Chandra A et al. 2014; Grings M et al. 2017), e na síndrome de Sjögren-Larsson, onde ele aumentou a expressão residual de FALDH (do inglês *fatty aldehyde dehydrogenase*) em fibroblastos de pacientes (Gloerich J et al. 2006). Em humanos com deficiência de CPTII, o tratamento com BEZ também se mostrou eficiente em melhorar o

quadro clínico bem como as alterações bioquímicas (Bonfont JP et al. 2009). De maneira similar, o tratamento com BEZ em um paciente com acidemia glutárica do tipo II melhorou significativamente o quadro clínico deste indivíduo (Yamaguchi S et al. 2012). Contudo, os efeitos do tratamento com BEZ em humanos com outras doenças que não dislipidemias ainda se mostram controversos (Orngreen MC et al. 2015) e, portanto, mais estudos são necessários.

I. 4 OBJETIVOS

I. 4.1 Objetivo geral

Considerando que pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis pelos sintomas neurológicos e dano hepático encontrados em pacientes portadores das MGTA e da HMGA, e que estudos indicam que os metabólitos acumulados são tóxicos (da Rosa MS et al. 2016; da Rosa MS et al. 2013), este trabalho investigou os efeitos *in vivo* da administração intraperitoneal do MGA sobre parâmetros de metabolismo energético, estresse oxidativo, biogênese e dinâmica mitocondrial e vias de sinalização em córtex cerebral e fígado de ratos. Além disso, visto que o tratamento disponível para essas acidúrias é limitado, também avaliamos os efeitos de um pré-tratamento com BEZ sobre os potenciais efeitos deletérios causados pelo MGA.

I. 4. 2 Objetivos específicos

Estudamos os efeitos *in vivo* do MGA no córtex cerebral e fígado de ratos sobre:

A) estresse oxidativo, através da determinação do dano oxidativo lipídico (níveis de malondialdeído-MDA), defesas antioxidantes não-enzimáticas, concentrações de glutathiona (GSH) e enzimáticas, atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona S-transferase (GST), e glicose-6-fostato desidrogenase (GPDH).

B) vias que estão envolvidas no metabolismo energético e biogênese mitocondrial, através da determinação do imunocnteúdo de PPAR γ , PGC-1 α (co-ativador 1 α de PPAR), Sirt1 (sirtuína 1), AKT (proteína cinase B) e AMPK.

C) vias potencialmente alteradas em situação de estresse oxidativo, através da medida do imunocnteúdo das MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos) ERK1/2, JNK e p38.

No córtex cerebral também foram determinados marcadores de dano neural: determinação do imunocnteúdo de Tau e sinaptofisina e caspase-3. Em plasma, analisamos os níveis de alanina transaminase e aspartato transaminase. Todos os parâmetros descritos acima também foram determinados em córtex cerebral e fígado de animais que receberam administração de MGA e bezafibrato.

PARTE II

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Capítulo I. A

Bezafibrate In Vivo Administration Prevents 3-Methylglutaric Acid-Induced Impairment of Redox Status, Mitochondrial Biogenesis, and Neural Injury in Brain of Developing Rats

Nevton Teixeira da Rosa-Junior, Belisa Parmeggiani, Mateus Struecker da Rosa, Nicolás Manzke Glänzel, Leonardo de Moura Alvorcem, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz

Artigo científico publicado no periódico Neurotoxicity Research
35:809–822 (2019)

Capítulo II

In Vivo Evidence that Bezafibrate Prevents Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction Caused by 3-Methylglutaric Acid in Rat Liver

Newton Teixeira da Rosa-Junior, Belisa Parmeggiani, Nicolás Manzke Glänzel, Leonardo de Moura Alvorcem, Marina Rocha Frusciantes, Carlos Severo Dutra Filho, Moacir Wajner, Guilhian Leipnitz.

Artigo científico publicado no periódico Biochimie
(171-172)187-196 (2020)

PARTE III
DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E
PERSPECTIVAS

III.1 DISCUSSÃO

Nos últimos 20 anos, dados da literatura têm mostrado uma gama de doenças metabólicas que resultam em elevada excreção urinária dos ácidos orgânicos MGA e MGT (Wortmann SB et al. 2013a). No entanto, em grande parte destas doenças, estes ácidos orgânicos são encontrados em níveis relativamente baixos (em torno de 40mmol/mol de creatinina) na urina dos pacientes, consistindo principalmente em um marcador para o diagnóstico dessas patologias (Wortmann SB et al. 2013a). Por outro lado, nas MGTA, é observada uma excreção urinária ainda mais elevada tanto de MGT quanto de MGA, os quais podem atingir concentrações maiores que 1.000mmol/mol de creatinina. Essas observações sugerem que tais ácidos possam causar efeitos deletérios nas MGTA (Wortmann SB et al. 2012; Wortmann SB et al. 2013a).

Além disso, cada tipo de MGTA (tipos I-V) apresenta características distintas quanto ao perfil clínico e genético, mas quando analisadas em grupo, pode-se observar que as alterações atingem principalmente o SNC, fígado e coração (Saudubray JM et al. 2016; Wortmann SB et al. 2012). Deve ser considerado também que estes tecidos são majoritariamente afetados em pacientes com HMGA, uma outra acidúria caracterizada pelo acúmulo de MGT e MGA (da Rosa MS et al. 2016; da Rosa MS et al. 2013; Dos Santos Mello M et al. 2015).

Tanto nas MGTA quanto na HMGA a inibição de vias metabólicas e acúmulo de intermediários podem resultar na ativação de vias metabólicas alternativas levando à produção elevada de MGA e MGT (da Rosa MS et al. 2013; Ikon N e Ryan RO 2017; Leipnitz G et al. 2009b; Wortmann SB et al.

2013b), como mencionado anteriormente. Deve ser salientado ainda que tanto os intermediários acumulados quanto os metabólitos alternativos podem resultar em toxicidade (da Rosa MS et al. 2013; Vistoli G et al. 2013; Weinstock NI et al. 2020). Neste contexto, modelos experimentais destas doenças têm mostrado alterações na bioenergética e no sistema redox (Colin-Gonzalez AL et al. 2016; Karkucinska-Wieckowska A et al. 2011; Leipnitz G et al. 2009a; Leipnitz G et al. 2009b; Leipnitz G et al. 2008). Assim, neste trabalho foi estudado o efeito *in vivo* do MGA em cérebro e fígado de ratos a fim de determinar outros mecanismos patológicos potencialmente envolvidos nas alterações fisiopatológicas e bioquímicas vistas nestas doenças metabólicas.

Outro ponto a ser destacado é que os tratamentos disponíveis para MGTA e HMGA ainda são limitados. Neste sentido, esta tese também procurou contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para essas doenças. Para esse propósito, administramos o BEZ nos ratos, um medicamento aprovado há mais de três décadas para o controle de dislipidemias (Al-Najdawi M et al. 2019), com o objetivo de avaliar se essa molécula poderia prevenir os efeitos tóxicos do MGA. Devido ao potencial bioenergético e antioxidante do BEZ (Al-Najdawi M et al. 2019), pesquisadores têm avaliado, principalmente em modelos animais, um possível reposicionamento deste fármaco para outros tipos de doenças, tais como as doenças de Parkinson e Huntington, e a deficiência da sulfito oxidase (Chandra A et al. 2014; Chandra A et al. 2016; Corona JC e Duchon MR 2015; Grings M et al. 2017). Visto que tanto em pacientes quanto em modelos experimentais para as MGTA e HMGA há evidência de alterações nos sistemas bioenergético

e redox, sugerimos que o BEZ poderia causar efeitos benéficos em nosso modelo animal e, assim, ser considerado um potencial adjuvante no tratamento dessas doenças metabólicas.

No primeiro capítulo desta tese foram estudados os efeitos da administração aguda de MGA sobre parâmetros de estresse oxidativo, biogênese mitocondrial e dano neural no córtex cerebral de ratos jovens. Ainda neste capítulo, foram analisados os possíveis efeitos neuroprotetores de BEZ sobre os mesmos parâmetros supracitados. A administração intraperitoneal de MGA (três injeções, sendo a primeira injeção de 10 $\mu\text{mol/g}$ seguida de duas injeções de 5 $\mu\text{mol/g}$) alterou de maneira diferente as enzimas antioxidantes diretas e indiretas aqui analisadas. O MGA resultou no aumento da expressão da proteína HO-1, a qual é uma enzima importante no processo de prevenção da formação de radicais livres, sugerindo um aumento da produção destas moléculas pelo MGA. A HO-1 atua na degradação de grupos heme livres que são naturalmente liberados durante a degradação de proteínas que o contenham e, assim, impede a reação de Fenton que produz o radical hidroxila (Chiang SK et al. 2018; Loboda A et al. 2016). O insulto com MGA também causou aumento na atividade de CAT, como anteriormente demonstrado pelo nosso grupo (da Rosa MS et al. 2013). Devido ao fato de a CAT fazer parte da primeira linha de defesa do sistema antioxidante celular, detoxificando o peróxido de hidrogênio oriundo de todos os compartimentos celulares e extracelulares (Karihtala P e Soini Y 2007), é possível supor que MGA induziu aumento de peróxido de hidrogênio no tecido analisado. Estes dados implicam em um quadro de desbalanço redox.

Somado a isso, o MGA causou diminuição da atividade das enzimas antioxidantes GPx e G6PDH. Esses efeitos podem ter ocorrido por ataque de espécies reativas a grupos considerados essenciais para a atividade dessas enzimas, como previamente mostrado em outras condições patológicas (da Rosa MS et al. 2013; Grings M et al. 2017; Singh P et al. 2004). Ainda, deve ser considerado que a diminuição da atividade da GPx pode ser resultado de uma diminuição da atividade da G6PDH. Neste contexto, a atividade basal da GPx é dependente da presença de GSH, a qual é, pelo menos em parte, proveniente da atividade da GR que utiliza NADPH para reciclar GSSG a GSH. O NADPH, por sua vez, é principalmente formado pela G6PDH (Lu J e Holmgren A 2014; McDonnell-Dowling K e Kelly JP 2017; Schwartz AG e Pashko LL 2004; Wu Y et al. 2019) (Figura 6).

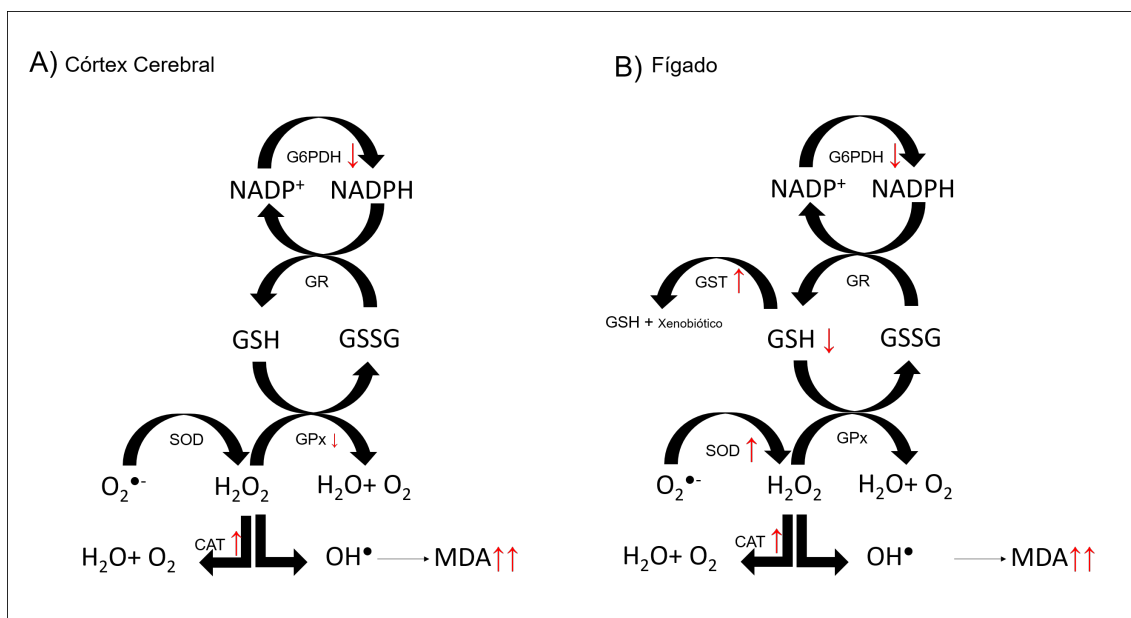


Figura 6. Alterações na homeostase redox causadas pelo MGA em córtex cerebral (A) e fígado (B) de ratos. Adaptado de McDonnell-Dowling (2017) e Wu (2019).

Visto que a GPx é uma das enzimas chave na detoxificação de lipídios oxidados e também de peróxido de hidrogênio (Katiyar SK et al. 2001), a sua diminuição pelo MGA pode explicar o aumento dos níveis de MDA observado. Notoriamente, danos a lipídios celulares, tanto no SNC quanto em tecidos periféricos, podem ocasionar alterações neurológicas importantes (D'Antonio M et al. 2009; Schmitt S et al. 2015) que podem, portanto, estar envolvidas no quadro clínico dos pacientes portadores de MGTA e HMGA.

O pré-tratamento com 30mg/kg/dia de BEZ preveniu o aumento dos níveis de MDA e as alterações vistas na atividade das enzimas CAT e GPx em córtex cerebral. Corroborando esses resultados, um estudo anterior demonstrou que o pré-tratamento com BEZ em um modelo animal da doença de Huntington com um quadro de estresse oxidativo, reduziu os níveis de MDA e restaurou a expressão de GPx e HO-1 (Johri A et al. 2012). Neste contexto, ainda vimos que uma dose maior de BEZ (100mg/kg/dia) preveniu totalmente a diminuição da atividade de G6PDH e as alterações nos níveis proteicos de HO-1, similarmente a dados apresentados por outros trabalhos da literatura (Grings M et al. 2017; Johri A et al. 2012). Desta forma, pode ser sugerido que os efeitos benéficos da ação do BEZ sobre a homeostase redox estão relacionados, pelo menos em parte, à regulação da expressão e modulação da atividade de enzimas antioxidantes.

Sabendo que a CTE é considerada a principal fonte de ROS celular e que um quadro de estresse oxidativo é frequentemente associado a disfunções mitocondriais (Halliwell B e Gutteridge JM 2015), este trabalho também avaliou a atividade dos complexos da CTE (I, II-III e IV) e a atividade de SDH, enzima

do ciclo de Krebs que converte succinato a fumarato e que também é parte do complexo II da CTE (Killian JK et al. 2013). Para nosso conhecimento, este trabalho é o primeiro a mostrar que o insulto com MGA pode resultar em diminuição da atividade de componentes da CTE em cérebro de ratos, além da atividade de SDH. Neste sentido, tem sido mostrado que alterações na atividade destes complexos, principalmente complexos I e III, resultam em aumento da produção de superóxido (Figueira TR et al. 2013) que, em primeira instância, é dismutado pela SOD e forma peróxido de hidrogênio (Murphy MP 2009). Isso vem de encontro aos resultados deste trabalho, onde o MGA aumentou a atividade de CAT, reforçando a conclusão de que MGA acarretou um insulto oxidativo. De maneira eficiente, o BEZ preveniu totalmente as alterações da atividade dos complexos da CTE e da atividade da SDH ocasionadas pelo ácido. Assim, nossos achados sugerem que as vias comumente ativadas por BEZ são importantes para a prevenção dos efeitos do acúmulo de MGA sobre a CTE no cérebro de ratos. Em concordância com isso, o BEZ tem mostrado eficácia em prevenir ou reverter alterações na fosforilação oxidativa por aumentar a atividade dos complexos da CTE em células de pacientes com doenças mitocondriais (Bastin J et al. 2008) e aumentar a quantidade de DNA mitocondrial, bem como os níveis de ATP celular em um modelo animal de miopatia mitocondrial (Wenz T et al. 2008). Esses trabalhos também salientam a importância da via do PPAR/PGC-1 α para a atividade de BEZ nos tecidos musculares analisados (Bastin J et al. 2008; Wenz T et al. 2008).

No entanto, no que tange aos efeitos da toxicidade do MGA sobre vias de sinalização no SNC, pouco havia sido estudado até agora. Foi demonstrado aqui que a administração de MGA culminou em diminuição dos níveis nucleares de PGC-1 α e também de sua variante produzido por *splicing* alternativo NT-PGC-1 α . A razão entre PGC-1 α nuclear e citosólico também foi diminuída pelo MGA, indicando diminuição da translocação deste co-ativador para o núcleo celular. Uma gama de moléculas podem modular a expressão e atividade do PGC-1 α , tais como hormônios tireoideanos, cinases ativadas por cálcio, p38, AMPK, Sirt1, PPAR e o próprio PGC-1 α , entre outros (Ventura-Clapier R et al. 2008). Neste contexto, ainda foi verificado que o insulto com MGA acarreta diminuição dos níveis proteicos de Sirt1 por vias ainda não elucidadas. A Sirt1 é uma deacetilase que comumente responde a alterações no nível energético celular (aumento de NAD⁺, por exemplo), deacetilando proteínas e fatores como o PGC-1 α (Ventura-Clapier R et al. 2008). Em decorrência destes resultados, pode ser sugerido que o MGA diminui a atividade da via Sirt1/ PGC-1 α e que o insulto agudo com este ácido resulta em prejuízos na biogênese mitocondrial, processo que é comumente ativado por esta via (Ventura-Clapier R et al. 2008).

Outro achado relevante foi que o pré-tratamento com BEZ causou aumento na translocação de PPAR γ e PGC-1 α para o núcleo, bem como preveniu a alteração dos níveis proteicos de Sirt1 induzida pelo MGA. Estudos sugerem que o PGC-1 α tem a habilidade de ativar diferentes fatores de transcrição em diferentes tecidos por atuar como um dímero ligado a esses fatores, tais como NRF-1 (*nuclear respiratory factor 1*) e todos os PPAR (Johri

A et al. 2012; Ventura-Clapier R et al. 2008). No caso da via do PGC-1 α /PPAR, esta é uma das principais vias de regulação da biogênese mitocondrial (Johri A et al. 2012; Ventura-Clapier R et al. 2008). A ativação de PGC-1 α /PPAR induzida por BEZ tem mostrado resultar em aumento da expressão do próprio PGC-1 α e também de PPAR, bem como de seus alvos moleculares, tais como citocromo c, TFAM e ATP sintase (Johri A et al. 2012). Além disso, esta mesma via pode provocar aumento da expressão de diferentes genes envolvidos na resposta antioxidante celular como o do Nrf2, HO-1 e GPx (Johri A et al. 2012), assim, explicando também os nossos dados, demonstrando que o BEZ previne alterações de estresse oxidativo.

Considerando que a administração de MGA causa desequilíbrio redox no cérebro de ratos e que isso parece estar associado a prejuízos na atividade de complexos da CTE e biogênese mitocondrial, ainda quantificamos os níveis proteicos de Akt e o grau de fosforilação das MAPKs ERK1/2 e p38, as quais são moduladas por ROS (Jazvinscak Jembrek M et al. 2018; Papaconstantinou J 2019). O insulto com MGA promoveu diminuição do conteúdo de Akt e do nível de fosforilação da ERK1/2, e aumento da fosforilação da p38. De acordo com alterações corticais já observadas em outras doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, a inibição da via de PI3K/Akt pode induzir a cascata de morte celular e ainda diminuir parcialmente a atividade de PGC-1 α , resultando em prejuízos na biogênese mitocondrial (Jazvinscak Jembrek M et al. 2018; Shaerzadeh F et al. 2014).

No que se refere aos achados sobre as MAPKs, já foi observado que tanto a ativação de ERK1/2 quanto de p38 pode resultar em fosforilação de

p53, que previne a proliferação celular e ainda aumenta a expressão de fatores pró-apoptóticos em modelo de dano celular induzido por radiação UV (Jazvinscak Jembrek M et al. 2018). Visto que o MGA também resultou em aumento dos níveis de caspase-3 ativa, podemos especular que a diminuição da fosforilação de ERK1/2 pode ser uma resposta para compensar uma possível indução de apoptose ocasionada por atividade de p38 e/ou diminuição da ativação de Akt. Muito embora esperássemos uma diminuição do conteúdo de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 (Maji S et al. 2018), o MGA não alterou os níveis desta proteína, o que pode ser explicado pelo aumento de AMPK a qual é capaz de induzir a expressão de Bcl-2 (Liu C et al. 2020). Por outro lado, apesar de não ser possível explicar porque ocorre aumento da fosforilação de p38 e diminuição da fosforilação de ERK1/2, já foi observado que elevados níveis de p38 fosforilada podem estar associados ao aumento da fosforilação de Tau (Jazvinscak Jembrek M et al. 2018), o que foi mostrado ser causado pelo MGA. Esses achados sugerem que o MGA causa prejuízos a vias de sinalização envolvidas na sobrevivência celular e também induz dano neuronal.

A Tau é uma proteína que promove estabilização dos microtúbulos nos neurônios do SNC (Iqbal K et al. 2016). A hiperfosforilação da Tau induz mudanças conformacionais nesta proteína que a modifica para uma conhecida forma patológica que culmina em instabilidade dos microtúbulos e alterações sinápticas patológicas (Johnson GV e Stoothoff WH 2004). Como já mencionado anteriormente, nossos dados sugerem que a p38 seria a cinase responsável pela fosforilação da Tau (Jazvinscak Jembrek M et al. 2018).

Corroborando nossa hipótese de que o MGA causa dano neural, a administração deste ácido também provocou diminuição dos níveis de sinaptofisina, uma proteína de extrema importância para neurônios, pois favorece a exocitose de neuromoléculas (Kim E e Sheng M 2004). Já foi relatado em um modelo animal que a redução desta proteína está associada com déficit cognitivo e de aprendizagem (Schmitt U et al. 2009). Por outro lado, o BEZ preveniu também as alterações provocadas por MGA sobre a fosforilação de ERK1/2 e Tau, e nos conteúdos de Akt e sinaptofisina, mais uma vez mostrando a eficácia dessa molécula em prevenir danos ao córtex cerebral.

Considerando que parte dos pacientes portadores das MGTA e da HMGA apresentam alterações hepáticas com aumento de transaminases no plasma (da Rosa-Junior NT et al. 2020), e que o MGA aumentou os níveis de alanina aminotransferase no plasma de animais submetidos ao modelo aqui discutido, no capítulo 2 desta tese estudamos a influência do MGA sobre parâmetros de homeostase redox, bem como de bioenergética, biogênese e dinâmica mitocondrial em fígado de ratos utilizando o mesmo modelo apresentado no capítulo 1.

Similarmente aos resultados vistos no capítulo 1, o MGA também resultou em aumento dos níveis de MDA, sugerindo peroxidação lipídica. Visto que a administração intraperitoneal de um composto geralmente resulta em absorção mesentérica com consequente drenagem pela veia porta hepática (Turner PV et al. 2011), não é surpreendente que este ácido resulte em

alterações neste tecido, pois pode ser presumido que o fígado fica exposto a altas concentrações de MGA em nosso modelo animal (Turner PV et al. 2011).

Foi mostrado ainda que o MGA aumentou a atividade da GST, SOD e CAT. A GST realiza a detoxificação de xenobióticos através da conjugação da molécula com GSH, visando a remoção da molécula potencialmente tóxica do interior das células (Aoyama K e Nakaki T 2012). Como grandes concentrações de MGA têm se mostrado tóxicas para o fígado (da Rosa MS et al. 2013), podemos sugerir que o aumento da atividade da GST pode representar uma tentativa das células hepáticas em detoxificar esta molécula. Da mesma forma, como visto em outros trabalhos (da Rosa-Junior NT et al. 2019; da Rosa MS et al. 2013; Murphy MP 2009), o aumento do conteúdo de MDA e o aumento na atividade de CAT e SOD reforçam nossa hipótese de que elevadas concentrações de MGA aumentam os níveis de peróxido de hidrogênio também no fígado dos roedores. Neste contexto, este trabalho ainda mostra uma diminuição do conteúdo de GSH, a qual atua tanto na prevenção de oxidação de proteínas celulares quanto na detoxificação de xenobióticos e lipídios peroxidados (Díaz-Vivancos P et al. 2015; Jefferies H et al. 2003).

Também foi verificado que o MGA diminuiu a atividade de G6PDH no fígado, sugerindo que a diminuição de GSH pode ser oriunda, pelo menos em parte, de um elevado consumo de GSH pela GST e/ou por diminuição da regeneração de GSH por falta de NADPH devido à diminuição da atividade de G6PDH (Halliwell B e Gutteridge JM 2015). Esses resultados indicam que MGA é uma molécula que, quando em altas concentrações, resulta em estresse oxidativo não apenas no SNC, mas também no fígado. Enfatize-se aqui que o

fígado é um tecido com elevada capacidade regenerativa e possui um sistema antioxidante mais eficiente que o SNC (maior atividade de enzimas antioxidantes como a CAT) (Halliwell B e Gutteridge JM 2015), reforçando a elevada toxicidade do MGA a nível hepático.

O BEZ preveniu a peroxidação lipídica, a diminuição de GSH e as alterações vistas em GST e G6PDH causadas pelo MGA no fígado. Há evidências de que a ativação de PPAR γ em fígado é capaz de aumentar concentrações de GSH, diminuir níveis de MDA e regular os níveis de HO-1 (Li Z et al. 2019). Visto que o BEZ induz biogênese mitocondrial (El-Hattab AW et al. 2017b; Yatsuga S e Suomalainen A 2012), podemos supor que a prevenção das alterações está relacionada com a indução desse processo mitocondrial.

Assim, no próximo passo de nossa investigação, estudamos o conteúdo de PGC-1 α e de outras proteínas participantes de vias de sinalização relacionadas (Roman EA et al. 2010). Similarmente aos achados no tecido cerebral, o MGA também diminuiu os níveis de Sirt1 e Akt, além de reduzir a translocação de PGC-1 α para o núcleo das células hepáticas, indicando prejuízos na biogênese mitocondrial neste tecido. Além da diminuição dos níveis da Sirt1, é possível que a atividade desta enzima também esteja reduzida, uma vez que o MGA causa disfunção bioenergética, o que levaria à diminuição dos níveis de NADH. Enfatize-se aqui que a Sirt1 é ativada por NAD $^+$ e pode ser inibida por aumento da razão NADH/NAD $^+$ (Figura 7). Já os desfechos da ativação da via de Akt no fígado envolvem, comumente, crescimento, proliferação e diferenciação celular; assim, a diminuição da Akt pode estar associada com prejuízos na capacidade regenerativa hepática, o

que já foi observado ocorrer em resposta a hormônios (Marinho R et al. 2015; Sun JP et al. 2020). A provável diminuição na ativação da via Sirt1/PGC1 α ainda poderia explicar a diminuição da atividade da G6PDH causada pelo MGA (Grings M et al. 2017; Thiebold AL et al. 2017). O BEZ evitou totalmente a diminuição dos níveis de Sirt1, porém preveniu parcialmente a diminuição de PGC-1 α . A prevenção apenas parcial da redução de PGC-1 α aliada ao fato de que o BEZ não foi capaz de prevenir as alterações nas atividades da CAT e da SOD sugere que provavelmente o fígado é exposto a concentrações de MGA mais elevadas que o córtex cerebral dos roedores. Portanto, mesmo que o fígado apresente um sistema antioxidante mais eficiente que o cérebro (Elangovan V et al. 2000; Ndrepepa G 2018), as alterações hepáticas induzidas pelo MGA, pelo menos sobre biogênese mitocondrial e homeostase redox, parecem ser mais significativas.

O MGA também diminuiu a translocação de PPAR γ e aumentou seus níveis citosólicos no fígado. Como nosso modelo mimetiza um insulto agudo, provavelmente o aumento de PPAR γ no citosol ocorreu por uma resposta compensatória aos danos ocasionados pelo ácido. Também foi visto que o BEZ preveniu a diminuição de PPAR γ nuclear neste modelo. Em concordância com os nossos resultados, ativadores de PPAR γ geralmente têm a capacidade de reduzir a lipotoxicidade hepática (Kumar DP et al. 2020), impedir a infiltração de células imunes pró-inflamatórias (Li Z et al. 2019) e prevenir disfunções mitocondriais (De Nuccio C et al. 2020).

Curiosamente, a administração de MGA também elevou o conteúdo de AMPK α 1, outro regulador importante da biogênese mitocondrial (Jornayvaz FR

e Shulman GI 2010). A enzima AMPK é uma cinase comumente ativada em situações de déficit energético, podendo fosforilar o PGC-1 α e outros fatores que também respondem a alterações energéticas, culminando em uma adaptação mitocondrial para suprir elevadas demandas de energia (Canto C e Auwerx J 2009). Esse resultado mostrando aumento da AMPK aliado ao fato de que modificações na atividade das enzimas da CTE ocasionam prejuízos na produção de energia nas células (Aghanoori MR et al. 2019) nos levou a avaliar as atividades dos complexos da CTE. O MGA diminuiu a atividade do CII e CIV da CTE, mas aumentou o fluxo de elétrons do CII a CIII, sugerindo, portanto, alterações mitocondriais com provável déficit energético, o que poderia ter induzido um aumento dos níveis da AMPK como resposta adaptativa (Canto C e Auwerx J 2009). O BEZ somente atenuou as alterações do conteúdo de AMPK α 1. Esse efeito somado à prevenção também parcial da redução PGC-1 α nuclear pelo BEZ pode explicar a falha de BEZ em regular o fluxo de elétrons do CII-III e a atividade do CIV neste tecido, como observado em outros estudos (Aghanoori MR et al. 2019; Wang Y et al. 2019).

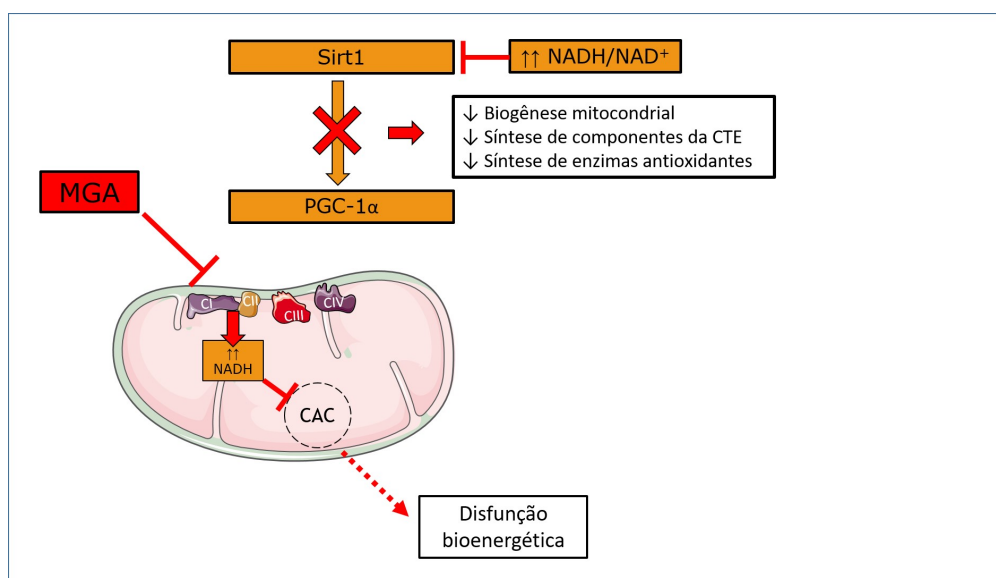


Figura 7. Esquema mostrando possíveis consequências das alterações bioenergéticas causadas pelo MGA nas vias de sinalização celulares. O ácido 3-metilglutárico (MGA) alterou a atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE), que geralmente resulta em acúmulo de NADH e disfunção bioenergética. Além disso, o possível aumento da razão NADH/NAD⁺ poderia inibir a atividade de Sirt1 e consequentemente diminuir a ativação e/ou translocação de PGC-1 α , alterando a biogênese mitocondrial (Autor: Nevton Teixeira da Rosa Junior, 2021).

É necessário considerar a importância da AMPK para alguns tipos de MGTA (tipos II-V). Vamecq e colaboradores (2020) recentemente sugeriram que a AMPK pode estar relacionada com o aumento dos níveis de MGT e consequentemente de MGA em alguns tipos de MGTA. Esses autores hipotetizaram que o aumento da atividade da AMPK resultaria em inibição da HMG-CoA redutase e da acetil-CoA carboxilase citosólica e também da sua forma mitocondrial, o que levaria à diminuição da síntese de colesterol e de ácidos graxos. Em consequência disso, ocorreria o direcionamento de acetil-CoA para os peroxissomos, onde então seria utilizado para a produção de MGT e também de MGA (Vamecq J et al. 2020). Dessa forma, é possível que em nosso modelo animal a administração de MGA esteja causando a produção de ainda mais MGA devido ao aumento dos níveis da AMPK.

Além disso, a atividade de AMPK pode implicar na ativação da mitofagia, processo que está claramente relacionado à dinâmica mitocondrial (Vamecq J et al. 2020). Dessa forma, também foram avaliados os níveis de MFN-1 e DRP-1, as principais proteínas envolvidas nos processos de fusão e fissão mitocondrial, respectivamente (Moghaddam FD et al. 2020). O MGA aumentou o conteúdo de ambas as proteínas, o que sugere uma grave desregulação da dinâmica mitocondrial, provavelmente em decorrência de dano mitocondrial (Moghaddam FD et al. 2020). Neste particular, outros trabalhos têm verificado que uma severa alteração na bioenergética acompanhada por estresse oxidativo pode resultar em alterações no conteúdo destas proteínas e dano na

morfologia mitocondrial (Leipnitz G et al. 2018; Seminotti B et al. 2019). De forma surpreendente, o BEZ preveniu o aumento do conteúdo de MFN-1, mas não o de DRP-1. Como a morfologia mitocondrial é determinada por um equilíbrio finamente controlado pelos processos de fusão e fissão (Chen H et al. 2003) e aumentos na DRP-1 tem sido associados à necessidade celular de degradação de regiões mitocondriais danificadas (Chen H et al. 2003), é possível inferir que as mitocôndrias deste tecido, em sua grande maioria, possivelmente apresentam um dano oxidativo significativo induzido pelo MGA, o que levou a uma persistente expressão de DRP-1 na tentativa de degradar regiões mitocondriais danificadas.

Embora os dados apresentados nos dois capítulos desta tese indiquem elevada toxicidade do MGA, tanto no tecido cerebral quanto no tecido hepático, é difícil extrapolarmos estes dados para os pacientes com HMGA e MGTA, pois não existem dados mostrando as concentrações exatas deste ácido orgânico no plasma ou tecidos destes pacientes. Entretanto, já foi mostrado que o MGA e outros ácidos orgânicos estão de fato acumulados no cérebro de pacientes com HMGA, porém as concentrações exatas ainda não foram estabelecidas (Roland D et al. 2017). Além disso, em um trabalho anterior de nosso grupo, foi possível mostrar que em nosso modelo as concentrações plasmáticas do MGA atingem em média 0,720 mM (da Rosa MS et al. 2013), ao passo que em outras acidemias orgânicas há relatos mostrando que os ácidos orgânicos podem ser encontrados em níveis de em torno de 5 mM no plasma dos pacientes (Kolker S et al. 2004; Wajner M 2019). Como visamos em nosso modelo mimetizar uma crise metabólica, situação caracterizada por maiores

níveis de MGA nos pacientes, é possível sugerir que a toxicidade de MGA pode contribuir, pelo menos em parte, para a fisiopatologia da doença.

No que concerne ao tratamento com BEZ, é complexo estabelecer uma dose que alcance os maiores benefícios em nosso modelo animal. Todavia, em outros estudos *in vivo*, doses maiores de BEZ (600-800mg/kg/dia) administradas por longos períodos (meses) têm sido aplicadas, causando efeitos benéficos aos roedores (Dillon LM et al. 2012; Huang Y et al. 2017; Johri A et al. 2012). Além disso, muito embora o uso de animais para experimentação de doses seja um bom ponto de início para o estudo de uma molécula com potencial protetor, ainda é difícil extrapolar nossos achados para seres humanos. Em estudos clínicos com pacientes com outras doenças hereditárias, é possível verificar o uso de dosagens de 200 a 600mg/dia dependendo da idade dos pacientes (Shiraishi H et al. 2019). Também é necessário salientar aqui que doses menores que essas, quando administradas por maiores períodos de tempo, apresentam benefícios para algumas doenças metabólicas hereditárias (Huang Y et al. 2017). É importante enfatizar ainda que atualmente há um estudo clínico para verificar a segurança da administração de BEZ em pacientes portadores da MGTAll (Registo N° ISRCTN58006579). Com dados ainda não publicados, este estudo clínico está de acordo com os resultados mostrados neste trabalho e com outras pesquisas pré-clínicas que mostram o potencial do uso deste fármaco em modelos *in vivo* para seu reposicionamento farmacológico para doenças metabólicas hereditárias.

Por outro lado, deve ser considerado que em um estudo clínico randomizado feito com pacientes portadores de defeitos de β -oxidação de ácidos graxos com alterações musculares, BEZ não demonstrou estimulação na taxa da β -oxidação mitocondrial e melhorias no desempenho desses indivíduos durante exercícios (Orngreen MC et al. 2014), isto sugere que o BEZ não apresenta os mesmos efeitos benéficos que foram verificados em modelos animais e células de pacientes portadores dessas doenças (Gobin-Limballe S et al. 2007; Orngreen MC et al. 2014). Ainda, é importante considerar aqui que possíveis efeitos adversos já foram relatados tanto do BEZ quanto de outros fibratos. Quando utilizados para o tratamento de hiperlipidemias por longos períodos de tempo, já foi verificado, em casos raros, o desenvolvimento de miopatias (Davidson MH et al. 2007). Outro raro efeito adverso observado é a redução na produção de prostaglandinas vasodilatadoras, resultando em moderado aumento de creatinina plasmática, sugerindo assim, alterações na atividade renal de alguns pacientes. Portanto, o uso de fibratos por indivíduos com alterações renais deve ter monitoramento constante (Davidson MH et al. 2007).

III.2 CONCLUSÕES

Nosso estudo mostra que o MGA, metabólito acumulado nas MGTA e na HMGA, promove alterações na atividade de enzimas antioxidantes diretas e indiretas, bem como diminui defesas antioxidantes não enzimáticas, causa dano mitocondrial e resulta em aumento de marcadores de danos celulares em córtex e fígado de ratos. Observamos também que as respostas celulares ao insulto agudo induzido por esse ácido podem variar entre os tecidos, porém os nossos achados indicam que tanto em córtex cerebral quanto em fígado ocorre um aumento de ROS que pode iniciar alterações em importantes vias de sinalização relacionadas à morte celular e prejuízos na dinâmica e bioenergética mitocondrial. Na presente tese, ainda foi verificado que o tratamento com BEZ foi capaz de prevenir a maioria das alterações observadas na homeostase redox e bioenergética, bem como nos marcadores de dano neural. Entretanto, o fígado dos roedores parece não ter respondido tanto quanto o córtex cerebral ao tratamento com BEZ, pois somente parte das alterações estudadas neste tecido foram prevenidas. Dois fatores estão influenciando fortemente esses achados: primeiramente, o fígado é um dos primeiros tecidos a entrar em contato com o ácido devido à via de administração empregada, indicando que este órgão é possivelmente exposto a maiores concentrações de MGA em nosso modelo; em segundo lugar, talvez seja necessário um pré-tratamento de BEZ com maior tempo de administração e/ou regulação da dosagem diária, como mostrado em estudos anteriores. Podemos concluir que elevadas concentrações de MGA causam toxicidade, modificando vias de biogênese e dinâmica mitocondrial, homeostase redox e

bioenergética, e que BEZ pode ser um fármaco promissor para uso como adjuvante no tratamento dessas doenças metabólicas.

III.3 PERSPECTIVAS

- a) Estudar os efeitos *in vivo* do MGA sobre outros parâmetros mitocondriais, tais como potencial de membrana mitocondrial e inchamento mitocondrial, e sobre atividades de outras enzimas chave do CAC, bem como sobre níveis de ATP em cérebro e fígado de roedores.
- b) Estudar os efeitos *in vivo* do MGA sobre outras proteínas marcadoras de biogênese mitocondrial em cérebro e fígado de roedores para melhor elucidar as vias pelas quais as alterações do ácido estão ocorrendo.
- c) Estudar os efeitos *in vivo* do MGA sobre a expressão gênica de enzimas do metabolismo energético em cérebro e fígado de roedores.
- d) Investigar o potencial efeito protetor do BEZ sobre as possíveis alterações nos parâmetros mitocondriais supracitados.

Referências

- Aghanoori MR, Smith DR, Shariati-Ilevari S, Ajisebutu A, Nguyen A, Desmond F, Jesus CHA, Zhou X, Calcutt NA, Aliani M, Fernyhough P (2019) Insulin-like growth factor-1 activates ampk to augment mitochondrial function and correct neuronal metabolism in sensory neurons in type 1 diabetes *Mol Metab* 20:149-165 doi:10.1016/j.molmet.2018.11.008
- Al-Najdawi M, Al-Jaidi B, Al-Balas Q, Al-Qirim T, Al-Hiari Y (2019) Synthesis, molecular docking and evaluation of hypolipidemic activities of novel benzophenonecarboxamide derivatives
- Al-Sayed M, Imtiaz F, Alsmadi OA, Rashed MS, Meyer BF (2006) Mutations underlying 3-hydroxy-3-methylglutaryl coa lyase deficiency in the saudi population *BMC Med Genet* 7:86 doi:10.1186/1471-2350-7-86
- al Aqeel A, Rashed M, Ozand PT, Brismar J, Gascon GG, al Odaib A, Dabbagh O (1994) 3-methylglutaconic aciduria: Ten new cases with a possible new phenotype *Brain Dev* 16 Suppl:23-32
- Anikster Y (1993) Costeff syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A (eds) *Genereviews*((r)). Seattle (WA),
- Anikster Y, Kleta R, Shaag A, Gahl WA, Elpeleg O (2001) Type iii 3-methylglutaconic aciduria (optic atrophy plus syndrome, or costeff optic atrophy syndrome): Identification of the opa3 gene and its founder mutation in iraqi jews *Am J Hum Genet* 69:1218-1224 doi:10.1086/324651
- Aoyama K, Nakaki T (2012) Inhibition of gtrap3-18 may increase neuroprotective glutathione (gsh) synthesis *Int J Mol Sci* 13:12017-12035 doi:10.3390/ijms130912017
- Aoyama Y, Yamamoto T, Sakaguchi N, Ishige M, Tanaka T, Ichihara T, Ohara K, Kouzan H, Kinoshada Y, Fukao T (2015) Application of multiplex ligation-dependent probe amplification, and identification of a heterozygous alu-associated deletion and a uniparental disomy of chromosome 1 in two patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa lyase deficiency *Int J Mol Med* 35:1554-1560 doi:10.3892/ijmm.2015.2184
- Arbelaez A, Castillo M, Stone J (1999) Mri in 3-methylglutaconic aciduria type 1 *Neuroradiology* 41:941-942
- Bastin J, Aubey F, Rotig A, Munnich A, Djouadi F (2008) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor pathway stimulates the mitochondrial respiratory chain and can correct deficiencies in patients' cells lacking its components *J Clin Endocrinol Metab* 93:1433-1441 doi:10.1210/jc.2007-1701
- Ben-Sahra I, Dirat B, Laurent K, Puissant A, Auberger P, Budanov A, Tanti JF, Bost F (2013) Sestrin2 integrates akt and mtor signaling to protect cells against energetic stress-induced death *Cell Death Differ* 20:611-619 doi:10.1038/cdd.2012.157
- Bizjak N, Zerjav Tansek M, Avbelj Stefanija M, Repic Lampret B, Mezek A, Drole Torkar A, Battelino T, Groselj U (2020) Precocious puberty in a girl with 3-methylglutaconic aciduria type 1 (3-mga-i) due to a novel auh gene mutation *Mol Genet Metab Rep* 25:100691 doi:10.1016/j.ymgmr.2020.100691

- Bonafe L, Troxler H, Kuster T, Heizmann CW, Chamoles NA, Burlina AB, Blau N (2000) Evaluation of urinary acylglycines by electrospray tandem mass spectrometry in mitochondrial energy metabolism defects and organic acidurias *Mol Genet Metab* 69:302-311 doi:10.1006/mgme.2000.2982
- Bonnefont JP, Bastin J, Behin A, Djouadi F (2009) Bezafibrate for an inborn mitochondrial beta-oxidation defect *N Engl J Med* 360:838-840 doi:10.1056/NEJMc0806334
- Brady PS, Scofield RF, Schumann WC, Ohgaku S, Kumaran K, Margolis JM, Landau BR (1982) The tracing of the pathway of mevalonate's metabolism to other than sterols *J Biol Chem* 257:10742-10746
- Brand MD, Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells *Biochem J* 435:297-312 doi:10.1042/BJ20110162
- Broide E, Elpeleg O, Lahat E (1997) Type iv 3-methylglutaconic (3-mgc) aciduria: A new case presenting with hepatic dysfunction *Pediatr Neurol* 17:353-355
- Canto C, Auwerx J (2009) Pgc-1alpha, sirt1 and ampk, an energy sensing network that controls energy expenditure *Curr Opin Lipidol* 20:98-105 doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4
- Cardoso ML, Rodrigues MR, Leao E, Martins E, Diogo L, Rodrigues E, Garcia P, Rolland MO, Vilarinho L (2004) The e37x is a common hmgcl mutation in portuguese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric coa lyase deficiency *Mol Genet Metab* 82:334-338 doi:10.1016/j.ymgme.2004.06.003
- Carmi N, Lev D, Leshinsky-Silver E, Anikster Y, Blumkin L, Kivity S, Lerman-Sagie T, Zerem A (2015) Atypical presentation of costeff syndrome-severe psychomotor involvement and electrical status epilepticus during slow wave sleep *Eur J Paediatr Neurol* 19:733-736 doi:10.1016/j.ejpn.2015.06.006
- Chan DC (2012) Fusion and fission: Interlinked processes critical for mitochondrial health *Annu Rev Genet* 46:265-287 doi:10.1146/annurev-genet-110410-132529
- Chandra A, Johri A, Beal MF (2014) Prospects for neuroprotective therapies in prodromal huntington's disease *Mov Disord* 29:285-293 doi:10.1002/mds.25835
- Chandra A, Sharma A, Calingasan NY, White JM, Shurubor Y, Yang XW, Beal MF, Johri A (2016) Enhanced mitochondrial biogenesis ameliorates disease phenotype in a full-length mouse model of huntington's disease *Hum Mol Genet* 25:2269-2282 doi:10.1093/hmg/ddw095
- Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry *Br Med Bull* 49:481-493 doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625
- Chen AT, Brady L, Bulman DE, Sundaram ANE, Rodriguez AR, Margolin E, Waye JS, Tarnopolsky MA (2019) An evaluation of genetic causes and environmental risks for bilateral optic atrophy *PLoS One* 14:e0225656 doi:10.1371/journal.pone.0225656
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins mfn1 and mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development *J Cell Biol* 160:189-200 doi:10.1083/jcb.200211046

- Chiang SK, Chen SE, Chang LC (2018) A dual role of heme oxygenase-1 in cancer cells *Int J Mol Sci* 20 doi:10.3390/ijms20010039
- Clarke SL, Bowron A, Gonzalez IL, Groves SJ, Newbury-Ecob R, Clayton N, Martin RP, Tsai-Goodman B, Garratt V, Ashworth M, Bowen VM, McCurdy KR, Damin MK, Spencer CT, Toth MJ, Kelley RI, Steward CG (2013) Barth syndrome *Orphanet J Rare Dis* 8:23 doi:10.1186/1750-1172-8-23
- Cole LK, Kim JH, Amoscato AA, Tyurina YY, Bay RH, Karimi B, Siddiqui TJ, Kagan VE, Hatch GM, Kauppinen TM (2018) Aberrant cardiolipin metabolism is associated with cognitive deficiency and hippocampal alteration in tafazzin knockdown mice *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864:3353-3367 doi:10.1016/j.bbadis.2018.07.022
- Colin-Gonzalez AL, Paz-Loyola AL, de Lima ME, Galvan-Arzate S, Seminotti B, Ribeiro CA, Leipnitz G, Souza DO, Wajner M, Santamaria A (2016) Experimental evidence that 3-methylglutaric acid disturbs mitochondrial function and induced oxidative stress in rat brain synaptosomes: New converging mechanisms *Neurochem Res* 41:2619-2626 doi:10.1007/s11064-016-1973-2
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease *FASEB J* 17:1195-1214 doi:10.1096/fj.02-0752rev
- Corona JC, Duchon MR (2015) Ppargamma and pgc-1alpha as therapeutic targets in parkinson's *Neurochem Res* 40:308-316 doi:10.1007/s11064-014-1377-0
- Cox MM, Doudna JA, O'Donnell M (2009) *Biologia molecular: Princípios e técnicas*. Artmed Editora,
- Cupo RR, Shorter J (2020) Skd3 (human clpb) is a potent mitochondrial protein disaggregase that is inactivated by 3-methylglutaconic aciduria-linked mutations *Elife* 9 doi:10.7554/eLife.55279
- D'Antonio M, Feltri ML, Wrabetz L (2009) Myelin under stress *J Neurosci Res* 87:3241-3249 doi:10.1002/jnr.22066
- da Rosa-Junior NT, Parmeggiani B, da Rosa MS, Glanzel NM, de Moura Alvorcem L, Wajner M, Leipnitz G (2019) Bezafibrate in vivo administration prevents 3-methylglutaric acid-induced impairment of redox status, mitochondrial biogenesis, and neural injury in brain of developing rats *Neurotox Res* 35:809-822 doi:10.1007/s12640-019-00019-9
- da Rosa-Junior NT, Parmeggiani B, Glanzel NM, de Moura Alvorcem L, Frusciante MR, Dutra Filho CS, Wajner M, Leipnitz G (2020) In vivo evidence that bezafibrate prevents oxidative stress and mitochondrial dysfunction caused by 3-methylglutaric acid in rat liver *Biochimie* 171-172:187-196 doi:10.1016/j.biochi.2020.03.007
- da Rosa MS, Seminotti B, Ribeiro CA, Parmeggiani B, Grings M, Wajner M, Leipnitz G (2016) 3-hydroxy-3-methylglutaric and 3-methylglutaric acids impair redox status and energy production and transfer in rat heart: Relevance for the pathophysiology of cardiac dysfunction in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a lyase deficiency *Free Radic Res* 50:997-1010 doi:10.1080/10715762.2016.1214952

- da Rosa MS, Seminotti B, Amaral AU, Fernandes CG, Gasparotto J, Moreira JC, Gelain DP, Wajner M, Leipnitz G (2013) Redox homeostasis is compromised in vivo by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa lyase deficiency in rat cerebral cortex and liver *Free Radic Res* 47:1066-1075 doi:10.3109/10715762.2013.853876
- da Rosa MS, Scaini G, Damiani AP, Longaretti LM, Pereira M, Seminotti B, Zapelini HG, Schuck PF, Streck EL, de Andrade VM, Wajner M, Leipnitz G (2015) Evidence that 3-hydroxy-3-methylglutaric and 3-methylglutaric acids induce DNA damage in rat striatum *Metab Brain Dis* 30:1055-1062 doi:10.1007/s11011-015-9675-z
- Dasouki M, Buchanan D, Mercer N, Gibson KM, Thoene J (1987) 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria: Response to carnitine therapy and fat and leucine restriction *J Inherit Metab Dis* 10:142-146 doi:10.1007/BF01800039
- Davey KM, Parboosingh JS, McLeod DR, Chan A, Casey R, Ferreira P, Snyder FF, Bridge PJ, Bernier FP (2006) Mutation of dnajc19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes dcma syndrome, a novel autosomal recessive barth syndrome-like condition *J Med Genet* 43:385-393 doi:10.1136/jmg.2005.036657
- Davidson MH, Armani A, McKenney JM, Jacobson TA (2007) Safety considerations with fibrate therapy *Am J Cardiol* 99:3C-18C doi:10.1016/j.amjcard.2006.11.016
- De Nuccio C, Bernardo A, Troiano C, Brignone MS, Falchi M, Greco A, Rosini M, Basagni F, Lanni C, Serafini MM, Minghetti L, Visentin S (2020) Nrf2 and ppar-gamma pathways in oligodendrocyte progenitors: Focus on ros protection, mitochondrial biogenesis and promotion of cell differentiation *Int J Mol Sci* 21 doi:10.3390/ijms21197216
- Diaz-Vivancos P, de Simone A, Kiddle G, Foyer CH (2015) Glutathione--linking cell proliferation to oxidative stress *Free Radic Biol Med* 89:1154-1164 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.023
- Dillon LM, Hida A, Garcia S, Prolla TA, Moraes CT (2012) Long-term bezafibrate treatment improves skin and spleen phenotypes of the mtdna mutator mouse *PLoS One* 7:e44335 doi:10.1371/journal.pone.0044335
- Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD (2001) Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to alzheimer's disease *J Neurosci* 21:4125-4133
- Dos Santos Mello M, Ribas GS, Wayhs CA, Hammerschmidt T, Guerreiro GB, Favenzani JL, Sitta A, de Moura Coelho D, Wajner M, Vargas CR (2015) Increased oxidative stress in patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria *Mol Cell Biochem* 402:149-155 doi:10.1007/s11010-014-2322-x
- Edmond J, Popjak G (1974) Transfer of carbon atoms from mevalonate to n-fatty acids *J Biol Chem* 249:66-71
- El-Hattab AW, Craigen WJ, Scaglia F (2017a) Mitochondrial DNA maintenance defects *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863:1539-1555 doi:10.1016/j.bbadis.2017.02.017
- El-Hattab AW, Zarante AM, Almannai M, Scaglia F (2017b) Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials *Mol Genet Metab* 122:1-9 doi:10.1016/j.ymgme.2017.09.009

- Elangovan V, Shohami E, Gati I, Kohen R (2000) Increased hepatic lipid soluble antioxidant capacity as compared to other organs of streptozotocin-induced diabetic rats: A cyclic voltammetry study *Free Radic Res* 32:125-134 doi:10.1080/10715760000300131
- Elpeleg ON, Costeff H, Joseph A, Shental Y, Weitz R, Gibson KM (1994) 3-methylglutaconic aciduria in the iraqi-jewish 'optic atrophy plus' (costeff) syndrome *Dev Med Child Neurol* 36:167-172 doi:10.1111/j.1469-8749.1994.tb11825.x
- Fassone E, Wedatilake Y, DeVile CJ, Chong WK, Carr LJ, Rahman S (2013) Treatable leigh-like encephalopathy presenting in adolescence *BMJ Case Rep* 2013:200838 doi:10.1136/bcr-2013-200838
- Fatica EM, DeLeonibus GA, House A, Kodger JV, Pearce RW, Shah RR, Levi L, Sandler Y (2019) Barth syndrome: Exploring cardiac metabolism with induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes *Metabolites* 9 doi:10.3390/metabo9120306
- Fernandes CG, da Rosa MS, Seminotti B, Pierozan P, Martell RW, Lagranha VL, Busanello EN, Leipnitz G, Wajner M (2013) In vivo experimental evidence that the major metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa lyase deficiency induce oxidative stress in striatum of developing rats: A potential pathophysiological mechanism of striatal damage in this disorder *Mol Genet Metab* 109:144-153 doi:10.1016/j.ymgme.2013.03.017
- Ferreira C, Thompson R, Vernon H (1993a) Barth syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A (eds) *Genereviews*((r)). Seattle (WA),
- Ferreira C, Pierre G, Thompson R, Vernon H (1993b) Barth syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A (eds) *Genereviews*((r)). Seattle (WA),
- Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JC, Kowaltowski AJ, Sluse FE, Souza-Pinto NC, Vercesi AE (2013) Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: From molecular mechanisms to human health *Antioxid Redox Signal* 18:2029-2074 doi:10.1089/ars.2012.4729
- Funghini S, Pasquini E, Cappellini M, Donati MA, Morrone A, Fonda C, Zammarchi E (2001) 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria in an italian patient is caused by a new nonsense mutation in the hmgcl gene *Mol Genet Metab* 73:268-275 doi:10.1006/mgme.2001.3191
- Gloerich J, Ijlst L, Wanders RJ, Ferdinandusse S (2006) Bezafibrate induces faldh in human fibroblasts; implications for sjogren-larsson syndrome *Mol Genet Metab* 89:111-115 doi:10.1016/j.ymgme.2006.05.009
- Goa KL, Barradell LB, Plosker GL (1996) Bezafibrate. An update of its pharmacology and use in the management of dyslipidaemia *Drugs* 52:725-753 doi:10.2165/00003495-199652050-00008
- Gobin-Limballe S, Djouadi F, Aubey F, Olpin S, Andresen BS, Yamaguchi S, Mandel H, Fukao T, Ruitter JP, Wanders RJ, McAndrew R, Kim JJ, Bastin J (2007) Genetic basis for correction of very-long-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency by bezafibrate in patient fibroblasts: Toward a genotype-based therapy *Am J Hum Genet* 81:1133-1143 doi:10.1086/522375

- Gonzalez IL (2005) Barth syndrome: Taz gene mutations, mrnas, and evolution *Am J Med Genet A* 134:409-414 doi:10.1002/ajmg.a.30661
- Grings M, Moura AP, Parmeggiani B, Pletsch JT, Cardoso GMF, August PM, Matte C, Wyse ATS, Wajner M, Leinritz G (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 doi:10.1016/j.bbadis.2017.05.019
- Gunay-Aygun M (2005) 3-methylglutaconic aciduria: A common biochemical marker in various syndromes with diverse clinical features *Mol Genet Metab* 84:1-3
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life *Plant Physiol* 141:312-322 doi:10.1104/pp.106.077073
- Halliwell B, Gutteridge JM (2015) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA,
- Hastings R, Steward C, Tsai-Goodman B, Newbury-Ecob R (2009) Dymorphology of barth syndrome *Clin Dymorphol* 18:185-187 doi:10.1097/MCD.0b013e32832a9e62
- He Q (2010) Tafazzin knockdown causes hypertrophy of neonatal ventricular myocytes *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H210-216 doi:10.1152/ajpheart.00098.2010
- Huang Y, Powers C, Moore V, Schafer C, Ren M, Phoon CK, James JF, Glukhov AV, Javadov S, Vaz FM, Jefferies JL, Strauss AW, Khuchua Z (2017) The ppar pan-agonist bezafibrate ameliorates cardiomyopathy in a mouse model of barth syndrome *Orphanet J Rare Dis* 12:49 doi:10.1186/s13023-017-0605-5
- Huizing M, Dorward H, Ly L, Klootwijk E, Kleta R, Skovby F, Pei W, Feldman B, Gahl WA, Anikster Y (2010) Opa3, mutated in 3-methylglutaconic aciduria type iii, encodes two transcripts targeted primarily to mitochondria *Mol Genet Metab* 100:149-154 doi:10.1016/j.ymgme.2010.03.005
- Ijlst L, Loupatty FJ, Ruitter JP, Duran M, Lehnert W, Wanders RJ (2002) 3-methylglutaconic aciduria type i is caused by mutations in auh *Am J Hum Genet* 71:1463-1466 doi:10.1086/344712
- Ikon N, Ryan RO (2017) Barth syndrome: Connecting cardiolipin to cardiomyopathy *Lipids* 52:99-108 doi:10.1007/s11745-016-4229-7
- Illsinger S, Lucke T, Zschocke J, Gibson KM, Das AM (2004) 3-methylglutaconic aciduria type i in a boy with fever-associated seizures *Pediatr Neurol* 30:213-215 doi:10.1016/j.pediatrneurol.2003.09.016
- Imai-Okazaki A, Kishita Y, Kohda M, Yatsuka Y, Hirata T, Mizuno Y, Harashima H, Hirono K, Ichida F, Noguchi A, Yoshida M, Tokorodani C, Nishiuchi R, Takeda A, Nakaya A, Sakata Y, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y (2018) Barth syndrome: Different approaches to diagnosis *J Pediatr* 193:256-260 doi:10.1016/j.jpeds.2017.09.075
- Iqbal K, Liu F, Gong CX (2016) Tau and neurodegenerative disease: The story so far *Nat Rev Neurol* 12:15-27 doi:10.1038/nrneurol.2015.225

- Jazvinscak Jembrek M, Slade N, Hof PR, Simic G (2018) The interactions of p53 with tau and ass as potential therapeutic targets for alzheimer's disease *Prog Neurobiol* 168:104-127 doi:10.1016/j.pneurobio.2018.05.001
- Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC (2003) Glutathione ANZ J Surg 73:517-522 doi:10.1046/j.1445-1433.2003.02682.x
- Johnson GV, Stoothoff WH (2004) Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction *J Cell Sci* 117:5721-5729 doi:10.1242/jcs.01558
- Johri A, Calingasan NY, Hennessey TM, Sharma A, Yang L, Wille E, Chandra A, Beal MF (2012) Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of huntington's disease *Hum Mol Genet* 21:1124-1137 doi:10.1093/hmg/ddr541
- Jornayvaz FR, Shulman GI (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis *Essays Biochem* 47:69-84 doi:10.1042/bse0470069
- Karihtala P, Soini Y (2007) Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies *APMIS* 115:81-103 doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_514.x
- Karkucinska-Wieckowska A, Lebiezinska M, Jurkiewicz E, Pajdowska M, Trubicka J, Szymanska-Debinska T, Suski J, Pinton P, Duszynski J, Pronicki M, Wieckowski MR, Pronicka E (2011) Increased reactive oxygen species (ros) production and low catalase level in fibroblasts of a girl with megal association (leigh syndrome, deafness, 3-methylglutaconic aciduria) *Folia Neuropathol* 49:56-63
- Karkucinska-Wieckowska A, Trubicka J, Werner B, Kokoszynska K, Pajdowska M, Pronicki M, Czarnowska E, Lebiezinska M, Sykut-Cegielska J, Ziolkowska L, Jaron W, Dobrzanska A, Ciara E, Wieckowski MR, Pronicka E (2013) Left ventricular noncompaction (lvnc) and low mitochondrial membrane potential are specific for barth syndrome *J Inherit Metab Dis* 36:929-937 doi:10.1007/s10545-013-9584-4
- Katiyar SK, Afaq F, Mukhtar H (2001) Effects of solar radiation on detoxification mechanisms in the skin. In: *Comprehensive series in photosciences, vol 3*. Elsevier, pp 419-436
- Killian JK, Kim SY, Miettinen M, Smith C, Merino M, Tsokos M, Quezado M, Smith WI, Jr., Jahromi MS, Xekouki P, Szarek E, Walker RL, Lasota J, Raffeld M, Klotzle B, Wang Z, Jones L, Zhu Y, Wang Y, Waterfall JJ, O'Sullivan MJ, Bibikova M, Pacak K, Stratakis C, Janeway KA, Schiffman JD, Fan JB, Helman L, Meltzer PS (2013) Succinate dehydrogenase mutation underlies global epigenomic divergence in gastrointestinal stromal tumor *Cancer Discov* 3:648-657 doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0092
- Kim E, Sheng M (2004) PdZ domain proteins of synapses *Nat Rev Neurosci* 5:771-781 doi:10.1038/nrn1517
- Kolker S, Koeller DM, Okun JG, Hoffmann GF (2004) Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-coa dehydrogenase deficiency *Ann Neurol* 55:7-12 doi:10.1002/ana.10784
- Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Pokrovsky AV, Melnikova NV, Kaprin AD, Moskalev AA, Snezhkina AV (2016) Mitochondrial dysfunction and

- oxidative stress in aging and cancer *Oncotarget* 7:44879-44905 doi:10.18632/oncotarget.9821
- Kumar DP, Caffrey R, Marioneaux J, Santhekadur PK, Bhat M, Alonso C, Koduru SV, Philip B, Jain MR, Giri SR, Bedossa P, Sanyal AJ (2020) The ppar alpha/gamma agonist saroglitazar improves insulin resistance and steatohepatitis in a diet induced animal model of nonalcoholic fatty liver disease *Sci Rep* 10:9330 doi:10.1038/s41598-020-66458-z
- Lehninger A, Nelson DL, Cox M (2019) *Princípios de bioquímica de lehninger*. 7^a edn.,
- Leipnitz G, Solano AF, Seminotti B, Amaral AU, Fernandes CG, Beskow AP, Dutra Filho CS, Wajner M (2009a) Glycine provokes lipid oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in brain cortex of young rats *Cell Mol Neurobiol* 29:253-261 doi:10.1007/s10571-008-9318-6
- Leipnitz G, Seminotti B, Fernandes CG, Amaral AU, Beskow AP, da Silva Lde B, Zanatta A, Ribeiro CA, Vargas CR, Wajner M (2009b) Striatum is more vulnerable to oxidative damage induced by the metabolites accumulating in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa lyase deficiency as compared to liver *Int J Dev Neurosci* 27:351-356 doi:10.1016/j.ijdevneu.2009.03.001
- Leipnitz G, Mohsen AW, Karunanidhi A, Seminotti B, Roginskaya VY, Markantone DM, Grings M, Mihalik SJ, Wipf P, Van Houten B, Vockley J (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 doi:10.1038/s41598-018-19543-3
- Leipnitz G, Seminotti B, Haubrich J, Dalcin MB, Dalcin KB, Solano A, de Bortoli G, Rosa RB, Amaral AU, Dutra-Filho CS, Latini A, Wajner M (2008) Evidence that 3-hydroxy-3-methylglutaric acid promotes lipid and protein oxidative damage and reduces the nonenzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex *J Neurosci Res* 86:683-693 doi:10.1002/jnr.21527
- Li Z, Jia Y, Feng Y, Cui R, Wang Z, Qu K, Liu C, Zhang J (2019) Methane-rich saline protects against sepsis-induced liver damage by regulating the ppar-gamma/nf-kappab signaling pathway *Shock* 52:e163-e172 doi:10.1097/SHK.0000000000001310
- Lin WD, Wang CH, Lai CC, Tsai Y, Wu JY, Chen CP, Tsai FJ (2009) Molecular analysis of taiwanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coa lyase deficiency *Clin Chim Acta* 401:33-36 doi:10.1016/j.cca.2008.11.004
- Liu C, Liang B, Wang Q, Wu J, Zou MH (2020) Withdrawal: Activation of amp-activated protein kinase alpha1 alleviates endothelial cell apoptosis by increasing the expression of anti-apoptotic proteins bcl-2 and survivin *J Biol Chem* 295:671 doi:10.1074/jbc.W119.012219
- Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J (2016) Role of nrf2/ho-1 system in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism *Cell Mol Life Sci* 73:3221-3247 doi:10.1007/s00018-016-2223-0
- Lu J, Holmgren A (2014) The thioredoxin antioxidant system *Free Radic Biol Med* 66:75-87 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036
- Ly TB, Peters V, Gibson KM, Liesert M, Buckel W, Wilcken B, Carpenter K, Ensenauer R, Hoffmann GF, Mack M, Zschocke J (2003) Mutations in

- the *auh* gene cause 3-methylglutaconic aciduria type i *Hum Mutat* 21:401-407 doi:10.1002/humu.10202
- Maji S, Panda S, Samal SK, Shriwas O, Rath R, Pellecchia M, Emdad L, Das SK, Fisher PB, Dash R (2018) Bcl-2 antiapoptotic family proteins and chemoresistance in cancer *Adv Cancer Res* 137:37-75 doi:10.1016/bs.acr.2017.11.001
- Marinho R, Mekary RA, Munoz VR, Gomes RJ, Pauli JR, de Moura LP (2015) Regulation of hepatic *trb3/akt* interaction induced by physical exercise and its effect on the hepatic glucose production in an insulin resistance state *Diabetol Metab Syndr* 7:67 doi:10.1186/s13098-015-0064-x
- McDonnell-Dowling K, Kelly JP (2017) The role of oxidative stress in methamphetamine-induced toxicity and sources of variation in the design of animal studies *Curr Neuropharmacol* 15:300-314 doi:10.2174/1570159x14666160428110329
- Moghaddam FD, Mortazavi P, Hamedi S, Nabiuni M, Roodbari NH (2020) Apoptotic effects of melittin on 4t1 breast cancer cell line is associated with up regulation of *mfn1* and *drp1* mRNA expression *Anticancer Agents Med Chem* 20:790-799 doi:10.2174/1871520620666200211091451
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species *Biochem J* 417:1-13 doi:10.1042/BJ20081386
- Ndrepepa G (2018) Uric acid and cardiovascular disease *Clin Chim Acta* 484:150-163 doi:10.1016/j.cca.2018.05.046
- Nystuen A, Costeff H, Elpeleg ON, Apter N, Bonne-Tamir B, Mhrenweiser H, Haider N, Stone EM, Sheffield VC (1997) Iraqi-jewish kindreds with optic atrophy plus (3-methylglutaconic aciduria type 3) demonstrate linkage disequilibrium with the *ctg* repeat in the 3' untranslated region of the myotonic dystrophy protein kinase gene *Hum Mol Genet* 6:563-569 doi:10.1093/hmg/6.4.563
- Ojala T, Polinati P, Manninen T, Hiippala A, Rajantie J, Karikoski R, Suomalainen A, Tyni T (2012) New mutation of mitochondrial *dnajc19* causing dilated and noncompaction cardiomyopathy, anemia, ataxia, and male genital anomalies *Pediatr Res* 72:432-437 doi:10.1038/pr.2012.92
- Orngreen MC, Vissing J, Laforet P (2015) No effect of bezafibrate in patients with *cptii* and *vlcad* deficiencies *J Inherit Metab Dis* 38:373-374 doi:10.1007/s10545-014-9779-3
- Orngreen MC, Madsen KL, Preisler N, Andersen G, Vissing J, Laforet P (2014) Bezafibrate in skeletal muscle fatty acid oxidation disorders: A randomized clinical trial *Neurology* 82:607-613 doi:10.1212/WNL.0000000000000118
- Papaconstantinou J (2019) The role of signaling pathways of inflammation and oxidative stress in development of senescence and aging phenotypes in cardiovascular disease *Cells* 8 doi:10.3390/cells8111383
- Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M (2000) A detailed interpretation of *oh* radical footprints in a *tbp*-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding *J Mol Biol* 304:55-68 doi:10.1006/jmbi.2000.4173
- Patil VA, Fox JL, Gohil VM, Winge DR, Greenberg ML (2013) Loss of cardiolipin leads to perturbation of mitochondrial and cellular iron homeostasis *J Biol Chem* 288:1696-1705 doi:10.1074/jbc.M112.428938

- Pei W, Kratz LE, Bernardini I, Sood R, Yokogawa T, Dorward H, Ciccone C, Kelley RI, Anikster Y, Burgess HA, Huizing M, Feldman B (2010) A model of costeff syndrome reveals metabolic and protective functions of mitochondrial opa3 Development 137:2587-2596 doi:10.1242/dev.043745
- Picard M, Wallace DC, Burelle Y (2016) The rise of mitochondria in medicine Mitochondrion 30:105-116 doi:10.1016/j.mito.2016.07.003
- Pisoschi AM, Pop A (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review Eur J Med Chem 97:55-74 doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
- Pospisilova E, Mrazova L, Hrda J, Martincova O, Zeman J (2003) Biochemical and molecular analyses in three patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria J Inherit Metab Dis 26:433-441 doi:10.1023/a:1025169210121
- Pronicka E, Piekutowska-Abramczuk D, Ciara E, Trubicka J, Rokicki D, Karkucinska-Wieckowska A, Pajdowska M, Jurkiewicz E, Halat P, Kosinska J, Pollak A, Rydzanicz M, Stawinski P, Pronicki M, Krajewska-Walasek M, Ploski R (2016) New perspective in diagnostics of mitochondrial disorders: Two years' experience with whole-exome sequencing at a national paediatric centre J Transl Med 14:174 doi:10.1186/s12967-016-0930-9
- Reynolds S (2015) Successful management of barth syndrome: A systematic review highlighting the importance of a flexible and multidisciplinary approach J Multidiscip Healthc 8:345-358 doi:10.2147/JMDH.S54802
- Roland D, Jissendi-Tchofo P, Briand G, Vamecq J, Fontaine M, Ulte V, Acquaviva-Bourdain C, Mention K, Dobbelaere D (2017) Coupled brain and urine spectroscopy - in vivo metabolomic characterization of hmg-coa lyase deficiency in 5 patients Mol Genet Metab 121:111-118 doi:10.1016/j.ymgme.2017.03.006
- Roman EA, Reis D, Romanatto T, Maimoni D, Ferreira EA, Santos GA, Torsoni AS, Velloso LA, Torsoni MA (2010) Central leptin action improves skeletal muscle akt, ampk, and pgc1 alpha activation by hypothalamic pi3k-dependent mechanism Mol Cell Endocrinol 314:62-69 doi:10.1016/j.mce.2009.08.007
- Ruesch S, Krahenbuhl S, Kleinle S, Liechti-Gallati S, Schaffner T, Wermuth B, Weber J, Wiesmann UN (1996) Combined 3-methylglutaconic and 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria with endocardial fibroelastosis and dilatative cardiomyopathy in male and female siblings with partial deficiency of complex ii/iii in fibroblasts Enzyme Protein 49:321-329 doi:10.1159/000468642
- Ryu SW, Jeong HJ, Choi M, Karbowski M, Choi C (2010) Optic atrophy 3 as a protein of the mitochondrial outer membrane induces mitochondrial fragmentation Cell Mol Life Sci 67:2839-2850 doi:10.1007/s00018-010-0365-z
- Sabbah HN (2021) Barth syndrome cardiomyopathy: Targeting the mitochondria with elamipretide Heart Fail Rev 26:237-253 doi:10.1007/s10741-020-10031-3
- Santarelli F, Cassanello M, Enea A, Poma F, D'Onofrio V, Guala G, Garrone G, Puccinelli P, Caruso U, Porta F, Spada M (2013) A neonatal case of 3-

- hydroxy-3-methylglutaric-coenzyme a lyase deficiency *Ital J Pediatr* 39:33 doi:10.1186/1824-7288-39-33
- Sarig O, Goldsher D, Nousbeck J, Fuchs-Telem D, Cohen-Katsenelson K, Iancu TC, Manov I, Saada A, Sprecher E, Mandel H (2013) Infantile mitochondrial hepatopathy is a cardinal feature of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical neurofibrillary changes (3-methylglutaconic aciduria type iv with sensorineural deafness, encephalopathy and leigh-like syndrome) caused by novel mutations in *serac1* *Am J Med Genet A* 161A:2204-2215 doi:10.1002/ajmg.a.36059
- Saudubray JM, Garcia-Cazorla A (2018) Inborn errors of metabolism overview: Pathophysiology, manifestations, evaluation, and management *Pediatr Clin North Am* 65:179-208 doi:10.1016/j.pcl.2017.11.002
- Saudubray JM, Baumgartner MR, Walter J (2016) Inborn metabolic diseases: Diagnosis and treatment. Springer Berlin Heidelberg,
- Saunders C, Smith L, Wibrand F, Ravn K, Bross P, Thiffault I, Christensen M, Atherton A, Farrow E, Miller N, Kingsmore SF, Ostergaard E (2015) Clpb variants associated with autosomal-recessive mitochondrial disorder with cataract, neutropenia, epilepsy, and methylglutaconic aciduria *Am J Hum Genet* 96:258-265 doi:10.1016/j.ajhg.2014.12.020
- Schmitt S, Castelvetti LC, Simons M (2015) Metabolism and functions of lipids in myelin *Biochim Biophys Acta* 1851:999-1005 doi:10.1016/j.bbali.2014.12.016
- Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE (2009) Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin *Neuroscience* 162:234-243 doi:10.1016/j.neuroscience.2009.04.046
- Schwartz AG, Pashko LL (2004) Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity *Ageing Res Rev* 3:171-187 doi:10.1016/j.arr.2003.05.001
- Scriver CR (2001) The metabolic & molecular bases of inherited disease. vol v. 4. McGraw-Hill,
- Seitz A, Hinck A, Bekeredjian R, Sechtem U (2020) Late diagnosis of Barth syndrome in a 39-year-old patient with non-compaction cardiomyopathy and neutropenia *ESC Heart Fail* 7:697-701 doi:10.1002/ehf2.12588
- Seminotti B, Leipnitz G, Karunanidhi A, Kochersperger C, Roginskaya VY, Basu S, Wang Y, Wipf P, Van Houten B, Mohsen AW, Vockley J (2019) Mitochondrial energetics is impaired in very long-chain acyl-coa dehydrogenase deficiency and can be rescued by treatment with mitochondria-targeted electron scavengers *Hum Mol Genet* 28:928-941 doi:10.1093/hmg/ddy403
- Shaerzadeh F, Motamedi F, Khodaghali F (2014) Inhibition of Akt phosphorylation diminishes mitochondrial biogenesis regulators, tricarboxylic acid cycle activity and exacerbates recognition memory deficit in rat model of Alzheimer's disease *Cell Mol Neurobiol* 34:1223-1233 doi:10.1007/s10571-014-0099-9
- Shiraishi H, Yamada K, Oki E, Ishige M, Fukao T, Hamada Y, Sakai N, Ochi F, Watanabe A, Kawakami S, Kuzume K, Watanabe K, Sameshima K, Nakamagoe K, Tamaoka A, Asahina N, Yokoshiki S, Miyakoshi T, Oba K, Ise T, Hayashi H, Yamaguchi S, Sato N (2019) Open-label clinical trial of bezafibrate treatment in patients with fatty acid oxidation disorders

- in japan; 2nd report qol survey Mol Genet Metab Rep 20:100496
doi:10.1016/j.ymgmr.2019.100496
- 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 260:153-159
- Smith C, Marks AD, Lieberman M (2007) Bioquímica médica básica de marks: Uma abordagem clínica. 2 edn.,
- Snanoudj S, Mordel P, Dupas Q, Schanen C, Arion A, Gerard M, Read MH, Nait Rabah D, Goux D, Chapon F, Jokic M, Allouche S (2019) Identification of a novel splice site mutation in the serac1 gene responsible for the megdhel syndrome Mol Genet Genomic Med 7:e815
doi:10.1002/mgg3.815
- Sofer S, Schweiger A, Blumkin L, Yahalom G, Anikster Y, Lev D, Ben-Zeev B, Lerman-Sagie T, Hassin-Baer S (2015) The neuropsychological profile of patients with 3-methylglutaconic aciduria type iii, costeff syndrome Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 168B:197-203
doi:10.1002/ajmg.b.32296
- Spoor J, Farajifard H, Rezaei N (2019) Congenital neutropenia and primary immunodeficiency diseases Crit Rev Oncol Hematol 133:149-162
doi:10.1016/j.critrevonc.2018.10.003
- Steward CG, Groves SJ, Taylor CT, Maisenbacher MK, Versluys B, Newbury-Ecob RA, Ozsahin H, Damin MK, Bowen VM, McCurdy KR, Mackey MC, Bolyard AA, Dale DC (2019) Neutropenia in barth syndrome: Characteristics, risks, and management Curr Opin Hematol 26:6-15
doi:10.1097/MOH.0000000000000472
- Stojanovic V, Doronjski A (2013) Mild form of 3-methylglutaconic aciduria type iv and mutation in the tmem70 genes J Pediatr Endocrinol Metab 26:151-154
doi:10.1515/jpem-2012-0291
- Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, Jiang F, Peng ZY (2019) Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis Oxid Med Cell Longev 2019:5080843
doi:10.1155/2019/5080843
- Sun JP, Shi L, Wang F, Qin J, Ke B (2020) Modified linggui zhugan decoction () ameliorates glycolipid metabolism and inflammation via pi3k-akt/mtor-s6k1/ampk-pgc-1 alpha signaling pathways in obese type 2 diabetic rats Chin J Integr Med doi:10.1007/s11655-020-3285-2
- Sweetman L, Williams J (2001) The metabolic and molecular bases of inherited disease. New york: Mcgraw-hill, .
- Tavasoli AR, Shervin Badv R, Zschocke J, Ashrafi MR, Rostami P (2017) Early infantile presentation of 3-methylglutaconic aciduria type 1 with a novel mutation in auh gene: A case report and literature review Brain Dev 39:714-716
doi:10.1016/j.braindev.2017.04.007
- Tenenbaum A, Fisman EZ (2012) Balanced pan-ppar activator bezafibrate in combination with statin: Comprehensive lipids control and diabetes prevention? Cardiovasc Diabetol 11:140
doi:10.1186/1475-2840-11-140
- Thiebold AL, Lorenz NI, Foltyn M, Engel AL, Dive I, Urban H, Heller S, Bruns I, Hofmann U, Drose S, Harter PN, Mittelbronn M, Steinbach JP, Ronellenfisch MW (2017) Mammalian target of rapamycin complex 1

- activation sensitizes human glioma cells to hypoxia-induced cell death
Brain 140:2623-2638 doi:10.1093/brain/awx196
- Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J (2018) Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms Essays Biochem 62:341-360 doi:10.1042/EBC20170104
- Tort F, Ugarteburu O, Texido L, Gea-Sorli S, Garcia-Villoria J, Ferrer-Cortes X, Arias A, Matalonga L, Gort L, Ferrer I, Guitart-Mampel M, Garrabou G, Vaz FM, Pristoupilova A, Rodriguez MIE, Beltran S, Cardellach F, Wanders RJ, Fillat C, Garcia-Silva MT, Ribes A (2019) Mutations in *tim50* cause severe mitochondrial dysfunction by targeting key aspects of mitochondrial physiology Hum Mutat 40:1700-1712 doi:10.1002/humu.23779
- Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA (2011) Administration of substances to laboratory animals: Routes of administration and factors to consider J Am Assoc Lab Anim Sci 50:600-613
- Vamecq J, Papegay B, Nuyens V, Boogaerts J, Leo O, Kruys V (2020) Mitochondrial dysfunction, ampk activation and peroxisomal metabolism: A coherent scenario for non-canonical 3-methylglutaconic acidurias Biochimie 168:53-82 doi:10.1016/j.biochi.2019.10.004
- van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S (2013) Mechanisms of mitochondrial fission and fusion Cold Spring Harb Perspect Biol 5 doi:10.1101/cshperspect.a011072
- Vargas CR, Sitta A, Schmitt G, Ferreira GC, Cardoso ML, Coelho D, Gibson KM, Wajner M (2008) Incidence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a lyase (hl) deficiency in brazil, south america J Inherit Metab Dis 31 Suppl 3:511-515 doi:10.1007/s10545-007-0756-y
- Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2008) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: The central role of *pgc-1alpha* Cardiovasc Res 79:208-217 doi:10.1093/cvr/cvn098
- Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G (2013) Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (ages and ales): An overview of their mechanisms of formation Free Radic Res 47 Suppl 1:3-27 doi:10.3109/10715762.2013.815348
- Vockley J, Zschocke J, Knerr I, Vockley CW, Michael Gibson K (2014) Branched chain organic acidurias. In: Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, Gibson KM, Mitchell G (eds) The online metabolic and molecular bases of inherited disease. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, NY,
- Wajner M (2019) Neurological manifestations of organic acidurias Nat Rev Neurol 15:253-271 doi:10.1038/s41582-019-0161-9
- Wang Y, Zhu S, Liu H, Wei W, Tu Y, Chen C, Song J, Li J, Sun S, Wang C, Xu Z (2019) Thyroxine alleviates energy failure, prevents myocardial cell apoptosis, and protects against doxorubicin-induced cardiac injury and cardiac dysfunction via the *lkb1/ampk/mtor* axis in mice Dis Markers 2019:7420196 doi:10.1155/2019/7420196
- Weinstock NI, Shin D, Dhimal N, Hong X, Irons EE, Silvestri NJ, Reed CB, Nguyen D, Sampson O, Cheng YC, Lau JTY, Bongarzone ER, Kofler J, Escolar ML, Gelb MH, Wrabetz L, Feltri ML (2020) Macrophages expressing *galc* improve peripheral krabbe disease by a mechanism

- independent of cross-correction *Neuron* 107:65-81 e69
doi:10.1016/j.neuron.2020.03.031
- Wenz T, Diaz F, Spiegelman BM, Moraes CT (2008) Activation of the ppar/pgc-1alpha pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype *Cell Metab* 8:249-256
doi:10.1016/j.cmet.2008.07.006
- Westrate LM, Drocco JA, Martin KR, Hlavacek WS, MacKeigan JP (2014) Mitochondrial morphological features are associated with fission and fusion events *PLoS One* 9:e95265 doi:10.1371/journal.pone.0095265
- Wortmann SB, Kluijtmans LA, Engelke UF, Wevers RA, Morava E (2012) The 3-methylglutaconic acidurias: What's new? *J Inherit Metab Dis* 35:13-22
doi:10.1007/s10545-010-9210-7
- Wortmann SB, Duran M, Anikster Y, Barth PG, Sperl W, Zschocke J, Morava E, Wevers RA (2013a) Inborn errors of metabolism with 3-methylglutaconic aciduria as discriminative feature: Proper classification and nomenclature *J Inherit Metab Dis* 36:923-928 doi:10.1007/s10545-012-9580-0
- Wortmann SB, Rodenburg RJ, Jonckheere A, de Vries MC, Huizing M, Heldt K, van den Heuvel LP, Wendel U, Kluijtmans LA, Engelke UF, Wevers RA, Smeitink JA, Morava E (2009) Biochemical and genetic analysis of 3-methylglutaconic aciduria type iv: A diagnostic strategy *Brain* 132:136-146 doi:10.1093/brain/awn296
- Wortmann SB, Kluijtmans LA, Rodenburg RJ, Sass JO, Nouws J, van Kaauwen EP, Kleefstra T, Tranebjaerg L, de Vries MC, Isohanni P, Walter K, Alkuraya FS, Smuts I, Reinecke CJ, van der Westhuizen FH, Thorburn D, Smeitink JA, Morava E, Wevers RA (2013b) 3-methylglutaconic aciduria--lessons from 50 genes and 977 patients *J Inherit Metab Dis* 36:913-921 doi:10.1007/s10545-012-9579-6
- Wu Y, Gu E, Li H, Tian C, Feng C (2019) Oxidative stress and histological changes in corbicula fluminea exposed to nano-al 13 and monomeric al coagulants *Environmental Science: Nano* 6:2736-2748
- Xie B, Wang S, Jiang N, Li JJ (2019) Cyclin b1/cdk1-regulated mitochondrial bioenergetics in cell cycle progression and tumor resistance *Cancer Lett* 443:56-66 doi:10.1016/j.canlet.2018.11.019
- Yahalom G, Anikster Y, Huna-Baron R, Hoffmann C, Blumkin L, Lev D, Tsabari R, Nitsan Z, Lerman SF, Ben-Zeev B, Pode-Shakked B, Sofer S, Schweiger A, Lerman-Sagie T, Hassin-Baer S (2014) Costeff syndrome: Clinical features and natural history *J Neurol* 261:2275-2282
doi:10.1007/s00415-014-7481-x
- Yalcinkaya C, Dincer A, Gunduz E, Ficicioglu C, Kocer N, Aydin A (1999) Mri and mrs in hmg-coa lyase deficiency *Pediatr Neurol* 20:375-380
- Yamaguchi S, Li H, Purevsuren J, Yamada K, Furui M, Takahashi T, Mushimoto Y, Kobayashi H, Hasegawa Y, Taketani T, Fukao T, Fukuda S (2012) Bezafibrate can be a new treatment option for mitochondrial fatty acid oxidation disorders: Evaluation by in vitro probe acylcarnitine assay *Mol Genet Metab* 107:87-91 doi:10.1016/j.ymgme.2012.07.004
- Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J, Bazhin AV (2016) Mitochondria and mitochondrial ros in cancer: Novel targets for anticancer therapy *J Cell Physiol* 231:2570-2581
doi:10.1002/jcp.25349

- Yatsuga S, Suomalainen A (2012) Effect of bezafibrate treatment on late-onset mitochondrial myopathy in mice *Hum Mol Genet* 21:526-535 doi:10.1093/hmg/ddr482
- Yilmaz Y, Ozdemir N, Ekinci G, Baykal T, Kocaman C (2006) Corticospinal tract involvement in a patient with 3-hmg coenzyme a lyase deficiency *Pediatr Neurol* 35:139-141 doi:10.1016/j.pediatrneurol.2006.01.009
- Zafeiriou DI, Vargiami E, Mayapetek E, Augoustidou-Savvopoulou P, Mitchell GA (2007) 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a lyase deficiency with reversible white matter changes after treatment *Pediatr Neurol* 37:47-50 doi:10.1016/j.pediatrneurol.2007.02.007
- Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W (2016) Ros and ros-mediated cellular signaling *Oxid Med Cell Longev* 2016:4350965 doi:10.1155/2016/4350965

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação ilustrativa da via de degradação da leucina. Os números representam as enzimas envolvidas em cada etapa da via: 1. Transaminase de aminoácido de cadeia ramificada; 2. Complexo desidrogenase de 2-cetoácido de cadeia ramificada; 3. Isovaleril-CoA desidrogenase; 4. Metil-crotonil-CoA carboxilase; 5. 3-Metil-glutaconil-CoA hidratase; 6. 3-Hidróxi-3-metilglutaril-CoA liase. Adaptado de Ijlst et al. (2002).
..... 7

Figura 2- Representação ilustrativa do remodelamento da cardioplipina. A figura demonstra a transferência de um grupo acil da fosfatidilcolina para a monolisocardioplipina resultando em dois produtos: a monofosfatidilcolina e a tetralinoleilcardioplipina (forma funcional do lipídio). Adaptado de Ikon e Ryan (2017).
..... 9

Figura 3- Representação ilustrativa das vias de produção de MGT e MGA sugeridas na MGTAlII. A figura demonstra em vermelho o deslocamento de intermediários do metabolismo do colesterol para a produção de 3-metilglutaconato em caso de inibição da HMG-CoA redutase. No quadro menor é possível ver o Pupjak Shunt que resultaria no deslocamento de dimetil-alil-pirofosfato para produção de 3-metilcrotonil. No lado direito da figura, é possível identificar a entrada dos ácidos orgânicos produzidos para a mitocôndria e sua alocação no metabolismo da leucina. Adaptado de Pei et al. (2010) e Anikster et al. (2006).
..... 12

Figura 4- Representação ilustrativa do bloqueio da via do metabolismo de leucina e formação de corpos cetônicos. A figura mostra a formação dos ácidos orgânicos ácido 3-metilglutacônico (MGT), ácido 3-metilglutárico (MGA) e ácido 3-hidróxi-3-metilglutárico (HMG). Adaptado de Sweetman e Williams (2001).
.....17

Figura 5- Representação ilustrativa da estrutura molecular dos fibratos mais utilizados no tratamento de dislipidemias. Adaptado de Al-Najdawi e colaboradores (2019).
..... 24

Figura 6- Alterações no sistema antioxidante enzimático causadas pelo MGA em córtex cerebral (A) e fígado (B) de ratos. Adaptado de McDonnell-Dowling (2017) e Wu e colaboradores (2019).
..... 83

Figura 7- Esquema mostrando possíveis consequências das alterações bioenergéticas causadas pelo MGA nas vias de sinalização celulares. O ácido 3-metilglutárico (MGA) alterou a atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE), que geralmente resulta em acúmulo de NADH e disfunção bioenergética. Além disso, o possível aumento da razão NADH/NAD⁺ poderia inibir a atividade de Sirt1 e consequentemente diminuir a ativação e/ou

translocação de PGC-1 α , alterando a biogênese mitocondrial (Autor: Nevtton
Teixeira da Rosa Junior, 2021).74

Anexo 1 – Cartas de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 33504

Título: AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM BEZAFIBRATO SOBRE OS EFEITOS DOS ÁCIDOS 3-METILGLUTACÔNICO E 3-METILGLUTÁRICO SOBRE A HOMEOSTASE REDOX E ENERGÉTICA EM CÉREBRO, CORAÇÃO E FIGADO DE RATOS JOVENS

Vigência: 21/06/2017 à 01/12/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

GUILHIAN LEIPNITZ - coordenador desde 21/06/2017
MOACIR WAJNER - pesquisador desde 21/06/2017
Mateus Grings - Aluno de Doutorado desde 21/06/2017
NÍCOLAS MANZKE GLÄNZEL - Aluno de Mestrado desde 21/06/2017
MATEUS STRUECKER DA ROSA - Aluno de Doutorado desde 21/06/2017
LEONARDO DE MOURA ALVORCEM - Aluno de Doutorado desde 21/06/2017
BELISA DOS SANTOS PARMEGGIANI - Aluno de Doutorado desde 21/06/2017
Nevton Teixeira da Rosa Junior - Aluno de Doutorado desde 21/06/2017

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 28/08/2017 - SALA 330 DO ANEXO - PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 440 ratos (machos e fêmeas) Wistar de 23 dias, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 13 de Dezembro de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética