

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

Cristiane Cecatto

**EFEITOS DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS ACUMULADOS NA
DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE ACILAS-COA DE CADEIA MUITO
LONGA SOBRE IMPORTANTES FUNÇÕES MITOCONDRIAS EM
CORAÇÃO, FÍGADO E MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Cecatto, Cristiane

Efeitos dos principais ácidos graxos acumulados na deficiência da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa sobre importantes funções mitocondriais em coração, fígado e músculo esquelético / Cristiane Cecatto. -- 2019.

166 f.

Orientador: Moacir Wajner.

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, 2019.

1. deficiência da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa. 2. mitocôndria. 3. bioenergética. 4. músculo cardíaco e esquelético. 5. fígado. I. Wajner, Moacir, orient. II. Título.

Cristiane Cecatto

**EFEITOS DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS ACUMULADOS NA
DEFICIÊNCIA DA DESIDROGENASE DE ACILAS-COA DE CADEIA MUITO
LONGA SOBRE IMPORTANTES FUNÇÕES MITOCONDRIAS EM
CORAÇÃO, FÍGADO E MÚSCULO ESQUELÉTICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Porto Alegre

2019

*Para minha família e para todas as
pessoas que acreditam na ciência*

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas estiveram presentes ao meu lado nesses quase quatro anos de doutorado e nove de laboratório.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Moacir Wajner que sempre me incentivou a realizar um bom trabalho, que se preocupou com o andamento da minha tese e que sempre pensou e ainda pensa no meu futuro.

Agradeço ao Dr. Alexandre Umpierrez Amaral, meu gênio pessoal da mitocôndria, que me guia nesse mundo desde os meus primeiros passos em 2010.

Agradeço aos colegas do laboratório por torcerem por mim e por pipetarem pra mim tantas vezes, neste último ano em especial à minha sempre amiga Bi, ao amigo Rafa por me instigar a discutir e dar minha opinião e a minha nova “mitoamiga” Ana Cristina, que mergulhou de cabeça na mitocôndria comigo.

Aos alunos do Guilhian por estarem sempre disponíveis para tirar uma dúvida ou para uma risada, em especial Bel e Mateus, por essa amizade de tantos anos.

Às minhas amigas da ciência Pâmela, Fernanda e Ângela, por todos os desabafos e piadas “nerds” trocadas.

Às minhas irmãs de alma Adriana e Joanna, que embarcaram comigo na aventura de morar em Porto Alegre e agora seguiram seu rumo por outras andanças: sinto saudades todos os dias.

Às minhas irmãs de sangue Ana Paula e Fabiane, cada uma em um canto do Brasil e mesmo assim nosso vínculo é muito sólido. Obrigada por me incentivarem a também ser mestra e doutora! Tenho muito orgulho da nossa relação.

Aos meus pais que nunca mediram esforços para que eu tivesse uma ótima educação e para que eu gostasse de estudar: obrigada por estarem sempre disponíveis, em todos os momentos.

Finalmente, obrigada ao meu marido Lucas que estampa seu orgulho por mim nos seus olhos, pelo amor, pelas infinitas risadas e por seu meu porto seguro.

*"Happiness can be found, even in
the darkest of times, if one only
remembers to turn on the light."*

Albus Dumbledore

ÍNDICE

PARTE I: RESUMO, INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO	9
1.2 OXIDAÇÃO MITOCONDRIAL DE ÁCIDOS GRAXOS	10
1.3 DOENÇAS GENÉTICAS DE OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	12
<i>1.3.1 Deficiência da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa</i>	
<i>(VLCADD)</i>	13
1.3.1.1 Diagnóstico.....	15
1.3.1.2 Tratamento	17
1.3.1.3 Fisiopatologia	19
1.4 MITOCÔNDRIA E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA.....	20
1.5 PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA HOMEOSTASE DO Ca²⁺	24
2. OBJETIVO GERAL.....	27
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
PARTE II: ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	29
CAPÍTULO I	30
CAPÍTULO II	50
CAPÍTULO III	94
PARTE III: DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	130
3. DISCUSSÃO	131
4. CONCLUSÕES	144
5. PERSPECTIVAS.....	147
REFERÊNCIAS.....	148

PARTE I: Resumo, Introdução e Objetivos

RESUMO

As doenças de oxidação mitocondrial de ácidos graxos são patologias genéticas reconhecidas como importantes causas de morbidade e mortalidade na população infanto-juvenil. Uma das mais comuns é a deficiência da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa (VLCAD). Essa doença é caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa e de seus conjugados de carnitina nos tecidos e líquidos biológicos dos pacientes afetados e, clinicamente, por disfunção cardíaca, hepática e muscular. Os ácidos cis-5-tetradecenoico (Cis-5) e mirístico (Myr) são os que mais se acumulam nessa doença, sendo que o primeiro é o marcador bioquímico. As disfunções cardíaca e hepática, que podem levar os pacientes à morte, bem como os recorrentes episódios de rabdomiólise ainda não possuem sua fisiopatologia esclarecida. A presente investigação objetivou estudar os efeitos desses metabólitos acumulados sobre parâmetros importantes da função mitocondrial (parâmetros respiratórios, potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), conteúdo de NAD(P)H, inchamento mitocondrial, capacidade de retenção de Ca^{2+} , liberação de citocromo c, produção de ATP, atividades dos complexos da cadeia respiratória e enzimas do ciclo do ácido cítrico) em mitocôndrias isoladas de coração, fígado e músculo esquelético de ratos jovens, bem como em fibras permeabilizadas de coração e de músculo esquelético e células hepáticas e cardíacas cultivadas. Verificamos que o Cis-5 e o Myr, em concentrações patológicas, reduziram significativamente os estados 3 e desacoplado da respiração celular, a produção de ATP, o $\Delta\Psi_m$ e a capacidade de retenção de Ca^{2+} nos três tecidos testados, bem como o conteúdo de NAD(P)H na matriz mitocondrial no coração, e a atividade do complexo I no coração, do complexo I-III no fígado e músculo esquelético e da enzima α -cetoglutarato desidrogenase no fígado. Estes ácidos graxos também aumentaram o estado 4 da respiração celular (efeito desacoplador) em todos os tecidos testados, com o envolvimento do translocador de nucleotídeos de adenina em coração e fígado, pois o carboxiatractilosídeo atenuou significativamente o aumento do estado 4 provocado pelos Cis-5 e Myr. Além disso, o Cis-5 e o Myr induziram inchamento mitocondrial e a liberação de citocromo c no fígado. Observamos ainda que os inibidores clássicos da formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) ciclosporina A mais ADP, bem como o inibidor da captação de Ca^{2+} rutênio vermelho preveniram completamente a diminuição do $\Delta\Psi_m$ mitocondrial em todos os tecidos testados, bem como a indução do inchamento mitocondrial em fígado, provocados pelo Myr e Cis-5 na presença de Ca^{2+} , sugerindo, respectivamente, que a indução da abertura do poro de MTP e a contribuição do Ca^{2+} estão envolvidas nesses efeitos. Os efeitos observados na respiração celular obtidos em mitocôndrias isoladas se confirmaram em preparações *in situ* de células cultivadas (cardiomiócitos e hepatócitos) e em fibras musculares cardíacas e esqueléticas, reforçando os efeitos deletérios desses ácidos graxos. Não foram observadas alterações na homeostase redox avaliados através do conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico e glutathiona reduzida em coração. Os achados no presente trabalho indicam que, em concentrações patológicas, os ácidos graxos de cadeia longa que mais se acumulam na deficiência da VLCAD prejudicam a bioenergética mitocondrial e a homeostase do Ca^{2+} , atuando como desacopladores e inibidores metabólicos da fosforilação oxidativa, além de serem indutores da abertura do poro de MPT em coração, fígado e músculo esquelético. Assim, presumimos que o comprometimento na bioenergética e na homeostase do Ca^{2+} possam contribuir para as manifestações cardíacas, hepáticas e musculares observadas na deficiência da VLCAD.

Palavras-chave: deficiência da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa; mitocôndria; bioenergética; coração; fígado; músculo esquelético.

ABSTRACT

The genetic fatty acid oxidation disorders are genetic pathologies recognized as important causes of morbidity and mortality in child-juvenile population. One of the most common is very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency. This disease is biochemically characterized by accumulation of fatty acids and their correspondent carnitine derivatives in tissues and biological fluids from affected patients, and clinically by cardiac, hepatic and muscular dysfunction. Cis-5-tetradecenoic (Cis-5) and myristic (Myr) acids are those that most accumulate in this disorder, wherein the first one is the biochemical hallmark. The cardiac and hepatic dysfunction, which may lead the patients to death, as well as the recurrent rhabdomyolysis episodes have the pathogenesis still poorly unknown. The present investigation was aimed to study the effects of these accumulated metabolites on important mitochondrial function parameters (respiratory parameters, membrane potential ($\Delta\Psi_m$), NAD(P)H content, mitochondrial swelling, Ca^{2+} retention capacity, cytochrome *c* release, ATP production, respiratory chain complexes and citric acid cycle enzymes activities) in isolated mitochondria of heart, liver and skeletal muscle from young rats, as well as in permeabilized heart and skeletal muscle fibers and hepatic and cardiac cultivated cells. We verified that Cis-5 and Myr, at pathological concentrations, strongly reduced states 3 and uncoupled of respiration, ATP production, $\Delta\Psi_m$ and Ca^{2+} retention capacity in all tested tissues, as well as matrix mitochondrial NAD(P)H content in heart, complex I activity in heart, complex I-III in liver and skeletal muscle and α -ketoglutarate dehydrogenase activity in liver. Also, these fatty acids increased state 4 respiration (uncoupling effect) in all tested tissues, with the involvement of the adenine nucleotide translocator in heart and liver since carboxyatractyloside significantly attenuated the increased state 4 respiration provoked by Cis-5 and Myr. In addition, Cis-5 and Myr caused mitochondrial swelling and cytochrome *c* release in liver. We also observed that the classical inhibitors of mitochondrial permeability transition (MPT) pore cyclosporin A plus ADP, as well as the Ca^{2+} uptake blocker ruthenium red, fully prevented the decrease of $\Delta\Psi_m$ in all tested tissues as well as mitochondrial swelling induction in liver provoked by Myr and Cis-5 in Ca^{2+} -loaded mitochondria, suggesting, respectively, induction of MPT pore opening and the contribution of Ca^{2+} in these effects. The effects observed in cellular respiration obtained in isolated mitochondria were confirmed in *in situ* cell preparations (cardiomyocytes and hepatocytes), as well as in cardiac and skeletal muscle fibers, reinforcing the deleterious effects of the fatty acids. In contrast, there were no alterations of redox homeostasis evaluated by the content of thiobarbituric acid reative species and reduced glutathione in heart. The present findings indicate that the major long-chain fatty acids that accumulate in VLCAD deficiency disrupt mitochondrial bioenergetics and Ca^{2+} homeostasis, acting as uncouplers and metabolic inhibitors of oxidative phosphorylation, as well as inducers of MPT pore opening in the heart, liver and skeletal muscle at pathological relevant concentrations. It is therefore presumed that disturbance of bioenergetics and Ca^{2+} homeostasis may contribute to the cardiac, hepatic and muscular manifestations observed in VLCAD deficiency.

Keywords: very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency; mitochondria; bioenergetics; heart; liver; skeletal muscle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral de bloqueio de uma rota metabólica que ocorre em erros inatos do metabolismo.....	9
Figura 2 - Esquema da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos.....	12
Figura 3 - Perfis de acilcarnitinas como seus ésteres butíricos no plasma de um indivíduo normal e de um paciente com VLCADD.....	17
Figura 4 - Estados da respiração mitocondrial.....	23
Figura 5 - Modelo padrão da homeostase mitocondrial de Ca^{2+}	26
Figura 6 - Esquema da reação catalizada pela transidrogenase mitocondrial de nucleotídeos de nicotinamida (NNT).....	140
Figura 7 - Disfunção mitocondrial na deficiência da VLCAD.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfato
ANT – translocador de nucleotídeos de adenina
AST – aspartato aminotransferase
ATP – adenosina trifosfato
CAC – ciclo do ácido cítrico
CAT – carboxiatractilosídeo
CCCP – cianeto de carbonila de meta-clorofenil-hidrazona
Cis-5 – ácido cis-5-tetradecenóico
CoA – coenzima A
CPT I – carnitina palmitoil transferase I
CPT II – carnitina palmitoil transferase II
CS – citrato sintase
CsA – ciclosporina A
CT – carnitina-acilcarnitina translocase
Cyp D – ciclofilina D
DGOAG – doenças genéticas de oxidação de ácidos graxos
DPC - dietilpirocarbonato
DTT – ditioneitol
EIM – erros inatos do metabolismo
FADH₂ – flavina adenina dinucleotídeo reduzido
GDH – glutamato desidrogenase
GDP – guanosina difosfato
GSH – glutationa reduzida
IDH – isocitrato desidrogenase
KT – cetotiolase
LCAD – acil-CoA desidrogenase de cadeia longa
LCEH – 2-enoil-CoA hidratase de cadeia longa
LCFA – ácidos graxos de cadeia longa
LCHAD – 3-hidroxi-acil-CoA desidrogenase de cadeia longa
LCKT – 3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia longa
MCAD – acil-CoA desidrogenase de cadeia média
MCT – triglicerídeos de cadeia média
MCU – sistema uniporte de Ca²⁺
MDA – malondialdeído
MDH – malato desidrogenase
mHCX – trocador H⁺/ Ca²⁺
mNCX – trocador Na⁺/ Ca²⁺
MTP – proteína trifuncional mitocondrial
Myr – ácido mirístico
NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NEM – N-etilmaleimida
NNT – transidrogenase mitocondrial de nucleotídeos de nicotinamida
OXPHOS – fosforilação oxidativa

PTP – poro de transição de permeabilidade
RCR – razão de controle respiratório
RMN – ressonância magnética nuclear
RR – rutênio vermelho
SCAD – acil-CoA desidrogenase de cadeia curta
SCEH – enoil-CoA hidratase de cadeia curta
SCHAD – 3-hidroxi-acil-CoA desidrogenase de cadeia curta
SDH – succinato desidrogenase
UCP – proteínas desacopladoras
VLCAD – acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa
VLCADD – deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa
 α -KGDH – α -cetoglutarato desidrogenase
 $\Delta\Psi_m$ – potencial de membrana mitocondrial

1. INTRODUÇÃO

1.1 ERROS INATOS DO METABOLISMO

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são doenças genéticas inicialmente descritas por Archibald Garrod em 1908, sendo a primeira a alcaptonúria, um EIM do metabolismo da tirosina e fenilalanina. Essas doenças são causadas por mutações em genes que levam à deficiência funcional de uma proteína, geralmente uma enzima, levando ao bloqueio de uma rota do metabolismo celular. Esse bloqueio leva ao acúmulo do substrato da via em questão e à falta dos produtos. O substrato acumulado pode, por rotas alternativas, gerar compostos que são potencialmente tóxicos (CHILDS; VALLE; JIMENEZ-SANCHEZ, 2014; SCRIVER et al., 2001) (Figura 1).

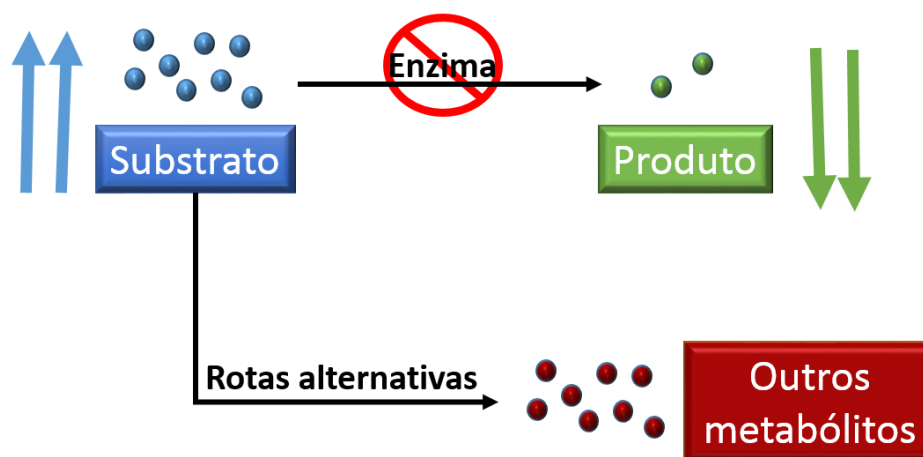


Figura 1. Esquema geral de bloqueio de uma rota metabólica que ocorre em erros inatos do metabolismo.

Apesar de serem individualmente raras, em conjunto essas doenças afetam aproximadamente um a cada 2500 recém-nascidos vivos (JEANMONOD; JEANMONOD, 2018), podendo chegar até a 1 a cada 800 recém-nascidos vivos, variando conforme a população (MAK et al., 2013; PAMPOLS, 2010). Até o momento, foram descritos mais de 1000 erros inatos do metabolismo com o defeito bioquimicamente caracterizado, a maioria deles envolvendo processos de síntese,

degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (ARNOLD, 2018). O fenótipo clínico desse grupo de doenças é heterogêneo (PAMPOLS, 2010; SCRIVER et al., 2001).

1.2 OXIDAÇÃO MITOCONDRIAL DE ÁCIDOS GRAXOS

A oxidação mitocondrial de ácidos graxos (β -oxidação) é a principal fonte de energia para os músculos esquelético e cardíaco, enquanto que no fígado se acentua especialmente durante o jejum e outras situações de estresse metabólico como em infecções, cirurgia, etc (EATON; BARTLETT; POURFARZAM, 1996). Nestas situações, a oxidação acentuada de ácidos graxos no fígado resulta na formação dos corpos cetônicos utilizados como fonte energética alternativa para órgãos extra-hepáticos, principalmente o cérebro e o coração. A β -oxidação representa, portanto, uma fonte energética importante para diversos órgãos essenciais à vida, como o coração, o cérebro, o fígado e os músculos esqueléticos (MITCHELL; FUKAO, 2014).

Os ácidos graxos de cadeia longa presentes no plasma entram na célula com o auxílio de proteínas de membrana transportadoras de ácidos graxos, que possuem também atividade de acil-CoA sintetase, levando à rápida formação de acil-CoA após a entrada na célula (HOUTEN; WANDERS, 2010). Na forma de acil-CoA, eles podem ser utilizados para formação de fosfolipídios, triglicerídeos e ésteres de colesterol ou entrar na mitocôndria para sofrerem a β -oxidação. Como a membrana mitocondrial é impermeável a acil-CoA, faz-se necessária conjugação com carnitina através da carnitina palmitoiltransferase I (CPT I) localizada na membrana externa da mitocôndria, onde são convertidos a acilcarnitinas que podem atravessar a membrana interna da mitocôndria através do transportador de

carnitina/acilcarnitina (CT). Uma vez na matriz mitocondrial, as acilcarnitinas são convertidas a acil-CoA com o auxílio da carnitina palmitoiltransferase II (CPT II), regenerando a carnitina (CHAE et al., 1999).

Os acil-CoA passam pela espiral da β -oxidação liberando uma acetil-CoA, um nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) e um flavina adenina dinucleotídeo reduzido (FADH₂) a cada ciclo (Figura 2). Esse acetil-CoA geralmente é oxidado no ciclo do ácido cítrico (CAC) a CO₂ nos tecidos. No fígado, é convertido a corpos cetônicos que são exportados para vários tecidos, tais como o cérebro e os músculos cardíaco e esquelético predominantemente em situações de estresse catabólico, como inflamação, infecções e jejum prolongado. O NADH e FADH₂ liberados atuam como equivalentes reduzidos para a cadeia transportadora de elétrons (NELSON; COX, 2017).

Cada ciclo na espiral da β -oxidação é mediado por quatro reações enzimáticas: acil-CoA desidrogenase, 2-enoil-CoA hidratase, L-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase e 3-cetoacil-CoA tiolase, sendo que os ácidos graxos são oxidados por enzimas específicas conforme o comprimento da sua cadeia carbônica (curta, média ou longa). Há ainda uma proteína trifuncional mitocondrial (MTP) acoplada à membrana interna da mitocôndria que é constituída por quatro subunidades α e quatro subunidades β (CARPENTER; POLLITT; MIDDLETON, 1992). As subunidades α contêm as atividades 2-enoil-CoA hidratase de cadeia longa (LCEH) e 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHAD), e as subunidades β contêm a atividade da 3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia longa (LCKT) (JLST et al., 1996). Após algumas voltas realizadas pela MTP, o acil-CoA com a cadeia de carbonos diminuída passa a ser metabolizado na matriz mitocondrial por enzimas com afinidade aos ácidos graxos de menor número de carbonos.

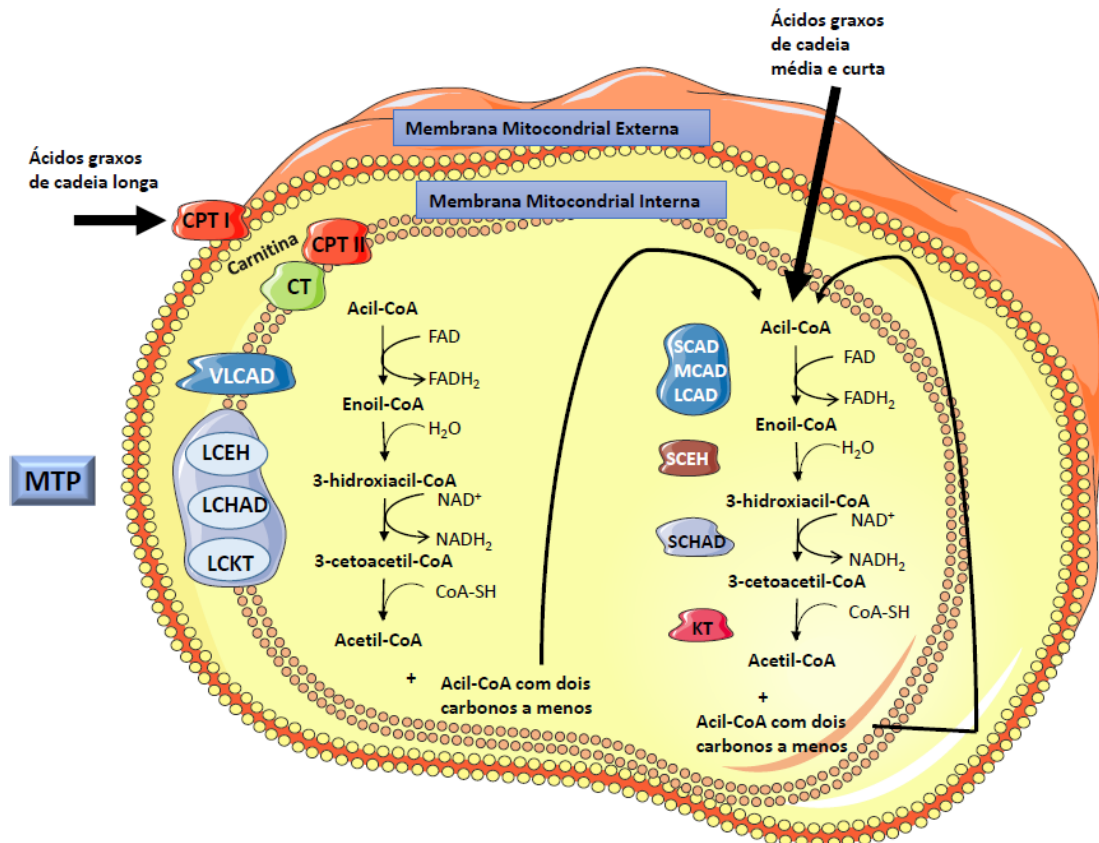


Figura 2. Esquema da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos. Carnitina palmitoil transferases I (CPT I) e II (CPT II); carnitina-acilcarnitina translocase (CT); acilas-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (VLCAD); proteína trifuncional mitocondrial (MTP); 2-enoil-CoA hidratase de cadeia longa (LCEH); 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHAD); 3-cetoacil-CoA tiolase de cadeia longa (LCKT); acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCAD); acilas-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD); acilas-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCAD); enoil-CoA hidratase de cadeia curta (SCEH); 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia curta (SCHAD); cetotiolase (KT). Fonte: própria autoria.

1.3 DOENÇAS GENÉTICAS DE OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Doenças genéticas da oxidação de ácidos graxos (DGOAG) têm sido reconhecidas nos últimos anos como importantes causas de morbidade e mortalidade, refletindo a significância fisiológica dos ácidos graxos como fonte essencial de energia para o ser humano. Atualmente já foram descritas pelo menos 17 diferentes entidades clínicas dentro deste grupo de doenças, com uma prevalência conjunta de 1 para 5000 nascimentos em algumas populações (VOCKLEY, JERRY; BENNETT; GILLINGHAM, 2014). As DGOAG podem ocorrer nas diferentes fases do metabolismo dos ácidos graxos, incluindo o ciclo da carnitina

e as reações de β -oxidação, sendo caracterizadas pelo acúmulo de ácidos graxos e seus conjugados de carnitina e glicina em tecidos e líquidos biológicos de pacientes afetados por essas doenças. O diagnóstico de pacientes suspeitos de DGOAG é, portanto, feito fundamentalmente pela quantificação de acilcarnitinas e ácidos graxos, bem como de L-carnitina, ocorrendo também aumento na excreção urinária de ácidos orgânicos dicarboxílicos e acilglicinas. A determinação das mutações envolvidas é crítica para o diagnóstico pré-natal dessas doenças e geralmente é feita quando há um ou mais casos na família. Já o diagnóstico no recém-nascido pelos testes de triagem é possível ser realizado para a grande maioria dessas doenças por espectrometria de massas em Tandem, mas é somente feito para algumas DGOAG, tais como deficiências de MCAD, VLCAD e LCHAD que seguem todos os requisitos para diagnóstico neonatal. No entanto, há uma tendência internacional de que várias outras dessas deficiências sejam incorporadas ao diagnóstico neonatal para diminuir a mortalidade e morbidade dos afetados, permitindo a implementação precoce de medidas estratégicas simples e de baixo custo, como dieta frequente e pobre em gorduras (VOCKLEY, JERRY et al., 2014).

As DGOAG cursam com uma ampla variedade de sintomas, tais como hipoglicemia, hiperamonemia, cardiomiopatia e hepatopatia neonatal e episódios recorrentes de rabdomiólise com hepatopatia iniciados na adolescência e idade adulta. A morbidade e a mortalidade são altas se o diagnóstico não é feito precocemente (VOCKLEY, JERRY et al., 2014).

1.3.1 Deficiência da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa (VLCADD)

A desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa (VLCAD) catalisa a primeira das quatro reações sequenciais da β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (C12 a C18) na mitocôndria e é codificada pelo gene *ACADVL*. A deficiência dessa enzima é um erro inato autossômico recessivo, com uma incidência de 1:30.000 a 1:100:000 (ARNOLD et al., 2009; LINDNER; HOFFMANN; MATERN, 2010; SPIEKERKOETTER et al., 2004; SPIEKERKOETTER; LINDNER; SANTER; GROTZKE; BAUMGARTNER; BOEHLES; DAS; HAASE; HENNERMANN; KARALL; DE KLERK; et al., 2009).

A apresentação clínica tem um espectro variável e os sintomas típicos geralmente aparecem após períodos de jejum ou em consequência de um processo infeccioso. Têm sido descritos três fenótipos gerais: o neonatal severo com cardiomiopatia, o infantil/adolescente com hipoglicemia hipocetótica, hepatopatia e rabdomiólise recorrente e o fenótipo adulto com somente rabdomiólise recorrente às vezes associado à hepatopatia (VOCKLEY, JERRY et al., 2014).

A forma neonatal severa é caracterizada pelo início dos sintomas muito cedo na vida, geralmente no período neonatal. Nesse grupo de pacientes a morbidade e mortalidade são altas e é comum se observar episódios recorrentes de hipoglicemia, acidose metabólica, rabdomiólise, cardiomiopatia e arritmia cardíaca. A cardiomiopatia é da forma dilatada ou hipertrófica, geralmente levando os pacientes a óbito. Aqueles que sobrevivem acabam por ter um prognóstico clínico semelhante ao fenótipo tardio, apresentando rabdomiólise recorrente na idade de 5 a 7 anos. A creatina cinase plasmática pode estar extremamente elevada e a mioglobínúria pode causar insuficiência renal necessitando hemodiálise. Os achados hepáticos são comuns, incluindo esteatose, inflamação e cirrose (GREGERSEN et al., 2001; KOMPARE; RIZZO, 2008; VOCKLEY, JERRY et al., 2014).

No fenótipo mais brando, com início dos sintomas mais tardio, ocorrem episódios de descompensação metabólica desencadeados também por febre e/ou jejum, sendo menos comum se observar cardiomiopatia, que dá lugar a hipoglicemia hipocetótica, hepatomegalia e hipotonia na infância. Conforme o paciente envelhece, a acidose metabólica e a hipoglicemia diminuem, os sintomas passam a ser dominados por dor muscular induzida por estresse ou exercício e rabdomiólise. A forma tardia, que se apresenta em adolescentes ou adultos jovens, geralmente é dominada pelos sintomas musculares e com frequência está associada com intolerância ao exercício e mioglobínúria. Os pacientes apresentam rabdomiólise recorrente, dor e fraqueza musculares que começam na adolescência e podem continuar por décadas antes do diagnóstico de deficiência da VLCAD (VLCADD) ser feito (GREGERSEN et al., 2001; KOMPARE; RIZZO, 2008; VOCKLEY, JERRY et al., 2014).

Durante as crises de descompensação metabólica observa-se um aumento significativo dos níveis dos metabólitos que tipicamente se acumulam nos líquidos biológicos e tecidos dos pacientes afetados por essa doença, tais como o ácido cis-5-tetradecenóico (Cis-5), que é o marcador para o diagnóstico, e o ácido mirístico (Myr), além de seus derivados de carnitina (VOCKLEY, JERRY et al., 2014).

1.3.1.1 Diagnóstico

O diagnóstico através da triagem neonatal permite o início do tratamento no período pré-sintomático, levando a um melhor prognóstico dos pacientes antes mesmo da manifestação dos sintomas. Desta forma, a triagem neonatal para VLCADD tem efeito benéfico na prevenção dos eventos de hipoglicemia nos

pacientes que possuem alguma atividade residual da enzima. Entretanto, para pacientes que tem atividade residual muito baixa ou ausente, a triagem neonatal não previne a hipoglicemia ou as complicações cardíacas, além de não ser possível estabelecer ainda os efeitos benéficos da triagem neonatal nas complicações relacionadas com a miopatia (BLEEKER et al., 2019).

O diagnóstico dessa doença é feito pelo aumento nas concentrações plasmáticas de acilcarnitinas insaturadas de cadeia longa (principalmente C14:1 e C14:2), podendo ser confirmado por teste enzimático ou molecular. A investigação diagnóstica inclui exames de rotina como dosagem de glicose, lactato, amônia, creatina cinase e eletrólitos, além de análise de ácidos orgânicos na urina que mostra aumento da excreção de ácidos dicarboxílicos. O perfil de acilcarnitinas é crítico para o diagnóstico, especialmente se for feito durante uma crise metabólica aguda e corresponde a um aumento predominante dos níveis de cis-5-tetradecenoilcarnitina (C14:1) (Figura 3). Durante as crises agudas também ocorre o aumento plasmático característico de outras acilcarnitinas (C14:0, C14:2, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 e C18:2), mas entre os períodos de descompensação metabólica somente as C14:1 e C14:2 podem estar elevadas (VOCKLEY, JERRY et al., 2014).

Quando há suspeita de VLCADD, o teste molecular é a forma mais correta de confirmar o diagnóstico. As mutações múltiplas no gene *ACADVL* têm sido estudadas *in vitro* e correlações genótipo/fenótipo têm sido detectadas (GOETZMAN et al., 2007; LAFORET et al., 2009; SCHIFF et al., 2013). Quando são encontradas duas mutações conhecidamente patogênicas, o diagnóstico definitivo é determinado. Entretanto, a atividade enzimática em fibroblastos obtidos de biópsia de pele e os estudos *in vitro* usando palmitato deuterado ou tritiado

podem ajudar no diagnóstico e avaliar o curso clínico (prognóstico) da doença (VIANEY-SABAN et al., 1998).

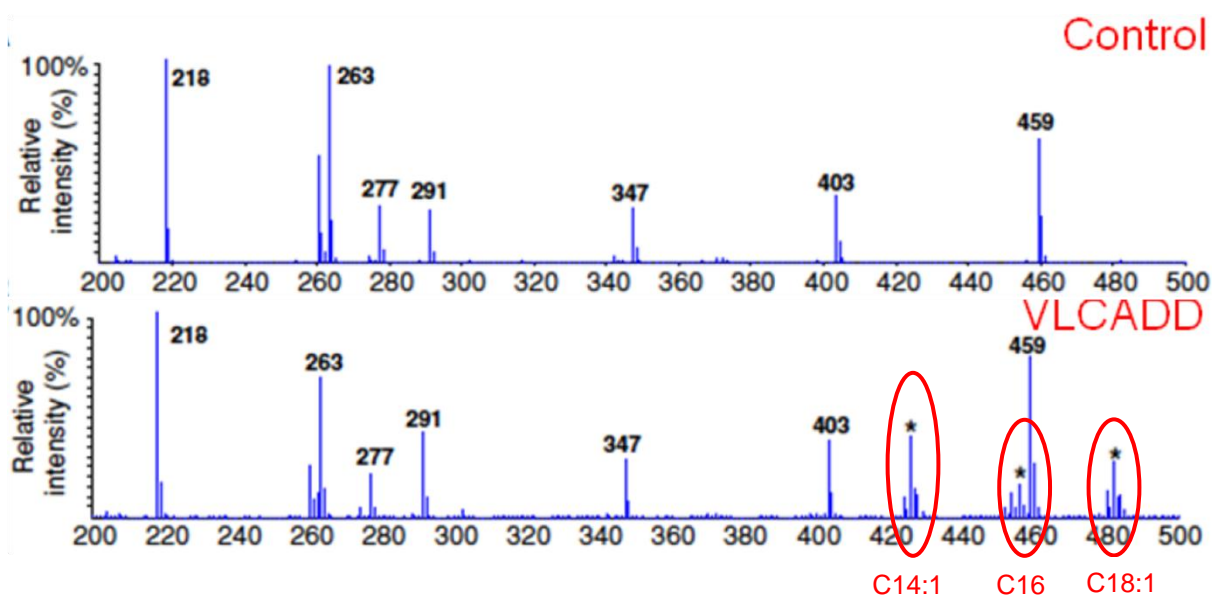


Figura 3. Perfis de acilcarnitinas como seus ésteres butíricos no plasma de um indivíduo normal e de um paciente com VLCADD. Observa-se aumento da tetradecenoilcarnitina (*C14:1; m/z 426), bem como de outras acilcarnitinas de cadeia longa (*C16, m/z 456; *C18:1, m/z 482). O número em cima de cada pico indica a razão m/z para carnitina livre (m/z 218) ou os padrões internos: m/z 263, D3-acetilcarnitina (C2); m/z 277, D3-propionilcarnitina (C3); m/z 291, D3-butilcarnitina (C4); m/z 347, D3-octanoilcarnitina (C8); m/z 403, D3-dodecanoilcarnitina (C12); m/z 459, D3-palmitoilcarnitina (C16). Adaptado de VOCKLEY, JERRY et al. (2014) e SMITH; MATERN (2010).

1.3.1.2 Tratamento

O objetivo do tratamento em todas as DGOAG é minimizar a oxidação de ácidos graxos evitando jejum e provendo calorias de outras fontes, principalmente durante situações de estresse metabólico (VOCKLEY, JERRY et al., 2014).

No caso da VLCADD, o tratamento consiste na substituição de triglicerídios de cadeia longa da dieta por triglicerídios de cadeia média (MCT) que podem ser totalmente oxidados na β -oxidação mitocondrial. A eficácia clínica do MCT é constatada pela prevenção ou atenuação da cardiomiopatia e dos sintomas musculares que os pacientes apresentam (TUCCI et al., 2013). Além disso, o uso de triglicerídios de cadeia ímpar como a trieptanoína e a suplementação com

bezafibrato (estimulador de função mitocondrial) foram demonstrados ser eficientes ao melhorar a miopatia e a rabdomiólise (BONNEFONT et al., 2010; ROE, C. R. et al., 2002). Recentemente, um ensaio clínico duplo cego randomizado usando trieptanoína *versus* trioctanoína (MCT regular) em DGOAG de cadeia longa concluiu que a triheptanoína melhorou significativamente a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, além de reduzir a massa em repouso do ventrículo esquerdo e a frequência cardíaca durante exercício comparado com a trioctanoína (GILLINGHAM et al., 2017). Também foi visto que a trieptanoína diminuiu a duração e taxa de hospitalização e a frequência da hipoglicemia (VOCKLEY, J. et al., 2015), além de melhorar a resistência e tolerância ao exercício e a qualidade de vida dos pacientes (VOCKLEY, J. et al., 2017). Em um estudo de fase 2, o tratamento com trieptanoína por 78 semanas reduziu a frequência de eventos clínicos graves, aumentando a tolerância do exercício e a qualidade de vida. Como a maioria dos pacientes estava utilizando previamente o tratamento com MCT ao tratamento com trieptanoína, as mudanças significativas nos eventos clínicos sugerem que esta última droga significativamente melhora o prognóstico dos pacientes afetados (VOCKLEY, J. et al., 2018).

Já a suplementação com L-carnitina para DGOAG tem sido utilizada para corrigir a deficiência dessa substância e eliminar as acilcarnitinas tóxicas (WINTER, 2003). Entretanto, a utilização de L-carnitina é controversa por falta de comprovação científica (SPIEKERKOETTER et al., 2010) e devido a resultados obtidos em camundongos nocaute com VLCADD mostrando um risco elevado de arritmia causada pelo acúmulo de acilcarnitinas de cadeia longa (SPIEKERKOETTER; LINDNER; SANTER; GROTZKE; BAUMGARTNER; BOEHLES; DAS; HAASE; HENNERMANN; KARALL; KLERK; et al., 2009). Alguns pacientes apresentaram

crises recorrentes de rabdomiólise somente quando estavam fazendo suplementação de L-carnitina (WATANABE et al., 2018).

1.3.1.3 Fisiopatologia

A principal hipótese da fisiopatologia dos defeitos de β -oxidação é atribuída à deficiência de energia devido ao bloqueio da oxidação de ácidos graxos e à baixa disponibilidade de glicose e corpos cetônicos, especialmente em situações de catabolismo acelerado (OLPIN, 2013).

Além disso, tem sido proposta a toxicidade das acilcarnitinas de cadeia longa na patogênese na VLCADD (SPIEKERKOETTER; WOOD, 2010; TUCCI et al., 2013). Também tem sido postulado, mas ainda não demonstrado, que os ácidos graxos de cadeia longa que se acumulam nessa doença possam ser tóxicos para o coração, fígado e músculo esquelético, explicando os sintomas que os pacientes apresentam, principalmente em situações de descompensação metabólica nas quais as concentrações desses ácidos graxos aumentam muito.

Um estudo baseado em ressonância magnética nuclear (RMN) mostrou alterações morfológicas no músculo esquelético de pacientes com VLCADD, bem como aumento dos níveis de creatina fosfocinase e ácido láctico associado aos episódios de rabdomiólise, sugerindo um distúrbio na homeostase energética mitocondrial nesse tecido. Também foi observado em imagens de RMN de músculo esquelético de pacientes afetados um aumento do conteúdo de lipídios devido à lise celular ou secundário a processo inflamatório, indicando toxicidade desses compostos acumulados (DIEKMAN et al., 2014).

Para melhor estudar essa doença foi desenvolvido um modelo nocaute em camundongos, nos quais se manifesta o fenótipo semelhante ao que acomete os

seres humanos afetados. Esses animais apresentaram distúrbio bioenergético mitocondrial (EXIL et al., 2006), refletido pela diminuição do razão fosfocreatina/adenosina trifosfato (ATP) (TUCCI et al., 2014) e dos níveis de ATP (XIONG et al., 2014) que foram associados à disfunção cardíaca. Exil e colaboradores (2003) mostraram em diferentes tecidos de camundongos nocaute para VLCAD proliferação mitocondrial acelerada, que presumivelmente foi atribuída à β -oxidação comprometida associada à deficiência de energia. Além disso, também se observou através de RMN que a função cardíaca desses animais estava comprometida com um volume sistólico significativamente menor em comparação com camundongos do tipo selvagem (TER VELD et al., 2007). Também foi demonstrada através de RMN uma diminuição da fração de ejeção acompanhada por aumento de triglicerídeos e ceramidas no miocárdio de animais em jejum, sugerindo que o acúmulo dos compostos lipotóxicos possam contribuir para o desequilíbrio metabólico detectado durante jejum (BAKERMANS et al., 2013). Ademais, SPIEKERKOETTER et al. (2006) mostraram uma redução na taxa de gliconeogênese devido à diminuição dos níveis de di-hidroxiacetona fosfato e glicerol-3-fosfato, sugerindo prejuízo na disponibilidade de precursores de glicose a partir de glicerol.

Tendo em vista que a patogênese do dano tecidual múltiplo encontrado na VLCADD é pouco conhecida e a função mitocondrial, principalmente a homeostase bioenergética, é crítica para o funcionamento normal dos tecidos e órgãos ricos em mitocôndrias, descrevemos a seguir alguns aspectos importantes desse sistema celular que foram objetos de avaliação no presente trabalho.

1.4 MITOCÔNDRIA E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

A mitocôndria é a organela responsável pela regeneração de adenosina difosfato (ADP) a ATP através da fosforilação oxidativa. Além disso, é nessa organela que há a maior produção de espécies reativas de oxigênio como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, e também de defesas antioxidantes (CADENAS; DAVIES, 2000; KANDOLA; BOWMAN; BIRCH-MACHIN, 2015). É também responsável pela homeostase do cálcio e participa dos processos de morte celular (FINKEL et al., 2015; ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2015). É envolta por duas membranas, uma externa permeável a pequenas moléculas e íons, e uma interna impermeável à maioria das moléculas, incluindo ATP, ADP, fosfato inorgânico, piruvato, H^+ , NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), entre outras (NELSON; COX, 2017).

Os glicídeos, aminoácidos e ácidos graxos podem ser oxidados no CAC, entrando sob a forma de acetil-CoA ou outros intermediários do CAC e então oxidados completamente a CO_2 , fornecendo as coenzimas reduzidas NADH e $FADH_2$ que irão abastecer com elétrons a cadeia respiratória mitocondrial (NICHOLLS; FERGUSON, 2013).

A cadeia respiratória é composta por várias associações proteicas (complexos enzimáticos I, II, III, IV e V), bem como pelo citocromo *c* e por uma coenzima lipossolúvel (ubiquinona ou Coenzima Q10) (DI DONATO, 2000). NADH e $FADH_2$ fornecem elétrons para os complexos I e II, respectivamente, sendo estas as vias convencionais de entrada de elétrons. O complexo I, conhecido como NADH desidrogenase ou NADH: ubiquinona oxidoredutase, transfere os elétrons do NADH para a ubiquinona. O complexo II (sucinato desidrogenase) reduz a ubiquinona com elétrons do $FADH_2$ provenientes da oxidação do succinato a fumarato no CAC. O complexo III, citocromo *bc₁* ou ubiquinona-citocromo *c* oxidoredutase, catalisa a

redução do citocromo *c* a partir da ubiquinona reduzida. Na parte final da cadeia de transporte de elétrons, o complexo IV (citocromo *c* oxidase) catalisa a transferência de elétrons de moléculas reduzidas de citocromo *c* para O_2 , formando H_2O . São necessárias quatro moléculas de citocromo *c* para reduzir completamente uma molécula de O_2 . Todos esses complexos possuem grupamentos prostéticos específicos para desempenharem o papel de aceptores e doadores de elétrons (ABELES; FREY; JENKS, 1992). O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, através dos complexos I, III e IV, gerando um gradiente eletroquímico que pode ser utilizado pelo complexo V (ATP sintase) para a síntese de ATP. Dessa forma, o oxigênio permite a respiração mitocondrial (fosforilação oxidativa - OXPHOS) através da oxidação de substratos energéticos acoplado ao processo de fosforilação do ADP, ou seja, quando a energia do gradiente eletroquímico é dissipada pelo fluxo de prótons de volta para a matriz mitocondrial, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase para sintetizar moléculas de ATP, permitir o movimento de cálcio e outras moléculas para dentro e fora da mitocôndria (NELSON; COX, 2017; NICHOLLS; FERGUSON, 2013).

A respiração mitocondrial pode ser estimada através da medida do consumo de O_2 , sendo um excelente sensor da atividade da cadeia respiratória mitocondrial, uma vez que os processos de transferência de elétrons, bombeamento de prótons, formação do gradiente eletroquímico e síntese de ATP são acoplados e estão interligados ao consumo de O_2 . Experimentalmente, pode-se dividir a respiração mitocondrial em 5 estados respiratórios, sendo que os estados 3 e 4 são os mais comumente utilizados. O estado 3 representa o consumo de oxigênio quando as mitocôndrias, em um meio contendo substrato oxidável capaz de

estimular o fornecimento de elétrons para a cadeia respiratória, são expostas a ADP, estimulando o consumo de O_2 e produzindo ATP (estado fosforilante). O estado 4 geralmente é estimulado por oligomicina, um inibidor da ATP sintase, refletindo o consumo de O_2 necessário para a formação e manutenção do gradiente eletroquímico, reduzindo a taxa da respiração (estado não-fosforilante). Ainda, é possível utilizar compostos desacopladores da fosforilação oxidativa, como o cianeto de carbonila de meta-clorofenil-hidrazona (CCCP), os quais provocam um vazamento de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, estimulando a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e o consumo de O_2 sem produção de ATP (estado desacoplado) (NICHOLLS; FERGUSON, 2013).

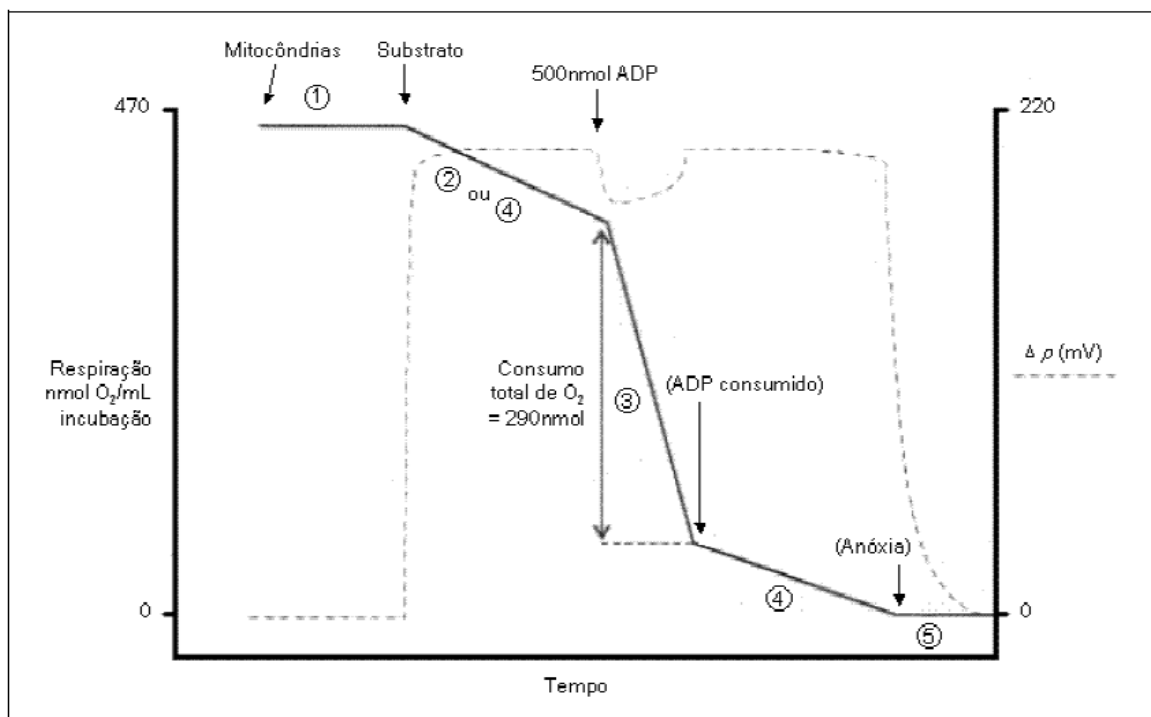


Figura 4. Estados da respiração mitocondrial. As mitocôndrias são adicionadas a uma cuba com um eletrodo de oxigênio (estado 1), seguida da adição de substrato (estado 2) (há fosfato inorgânico disponível). A respiração é lenta pois o circuito de prótons não está completo com a reentrada de H^+ pela ATP sintase. Existe uma respiração devido ao vazamento de prótons pela membrana. É adicionado ADP, permitindo a síntese de ATP pela ATP sintase acoplada à reentrada de prótons (estado 3). Quando todo o ADP adicionado é convertido a ATP a respiração fica lenta novamente (estado 4) até que finalmente o oxigênio da cuba termina levando à anóxia (estado 5) (Adaptado de NICHOLLS; FERGUSON, 2002)

É possível medir experimentalmente, além da respiração mitocondrial, o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) através da fluorescência do reagente catiônico safranina O, o inchamento por meio da turbidez e da luz espalhada da amostra, a produção de peróxido de hidrogênio pela reação acoplada onde a peroxidase oxida o reagente ampliflu red formando resorufina que emite fluorescência ao mesmo tempo em que transforma o H_2O_2 em O_2 . A capacidade de retenção de Ca^{2+} é medida pela fluorescência do detector de cálcio *calcium green* e o conteúdo de nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) reduzida (NAD(P)H) mitocondrial é medido pela autofluorescência desses compostos. (MACIEL et al., 2004; SAITO; CASTILHO, 2010).

1.5 PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA HOMEOSTASE DO Ca^{2+}

Uma função crucial desempenhada por mitocôndrias é manter a homeostase celular de Ca^{2+} , já que ele é fundamental para sinalizar e controlar uma série de eventos intracelulares. Essa organela tem a capacidade, quando íntegra e funcional, de captar o Ca^{2+} presente no citosol ou liberar seu estoque para a célula, mantendo a concentração intracelular desse cátion em condições ótimas para o funcionamento celular (FIGUEIRA et al., 2013; RIZZUTO et al., 2012). A proteína transportadora mitocondrial responsável pela captação do Ca^{2+} foi recentemente elucidada, sendo um sistema uniporte de captação de Ca^{2+} (MCU) (figura 5) (BAUGHMAN et al., 2011; DE STEFANI et al., 2011; MARCHI; PINTON, 2014; PAN et al., 2013; PENDIN; GREOTTI; POZZAN, 2014). Por outro lado, a liberação de Ca^{2+} para a matriz é realizada pelos trocadores Na^+/Ca^{2+} (mNCX) e H^+/Ca^{2+} (mHCX) (BERNARDI, P.; VON STOCKUM, 2012; RIZZUTO et al., 2012).

Quando a célula está com sobrecarga citosólica de Ca^{2+} , que pode ser muito prejudicial para o funcionamento celular, a capacidade da mitocôndria de captar e reter Ca^{2+} contribui para o tamponamento do excesso citosólico desse cátion (FIGUEIRA et al., 2013; RIZZUTO et al., 2012). Por outro lado, uma elevada captação mitocondrial de Ca^{2+} , além da sua capacidade de retenção, pode levar a uma condição conhecida como transição de permeabilidade, resultado da abertura de um poro na membrana mitocondrial interna (ADAM-VIZI; STARKOV, 2010; STARKOV, 2010; ZORATTI; SZABO, 1995). O poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial é formado por proteínas com identidades ainda pouco conhecidas (STARKOV, 2010), apesar de já ser reconhecido o papel da ciclofilina D (Cyp D) como um componente chave para a abertura do PTP (BAINES et al., 2005; BASSO et al., 2005; BERNARDI, PAOLO, 2013; TANVEER et al., 1996).

A permanente abertura do PTP resulta em consequências funestas para a célula, tais como a liberação de Ca^{2+} para o citosol, inchamento mitocondrial, liberação de fatores apoptogênicos intramitocondriais como o citocromo c (LIU et al., 1996), despolarização mitocondrial, perda de íons e metabólitos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , glutationa reduzida (GSH), NADH e NADPH), comprometimento da síntese de ATP e morte celular (apoptose e necrose) (BERNARDI, P.; VON STOCKUM, 2012; CROMPTON et al., 1999; RASOLA; BERNARDI, 2011; RIZZUTO et al., 2012). Muitos trabalhos *in vitro* e *in vivo* têm associado a indução do PTP com uma disfunção mitocondrial na presença de Ca^{2+} , demonstrando alteração nos parâmetros da homeostase bioenergética mitocondrial (MACIEL et al., 2004; MIRANDOLA et al., 2010; TONIN et al., 2014). Além disso, o ataque oxidativo por espécies reativas de oxigênio está descrito como um importante mecanismo potencializador da abertura do PTP (ADAM-VIZI; STARKOV, 2010;

KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001). Neste contexto, altas concentrações de NADH previnem a abertura do PTP, por promover a redução do NADP^+ catalisada pela transidrogenase mitocondrial e conseqüentemente melhoram a capacidade redox da mitocôndria (HOEK; RYDSTROM, 1988; LEHNINGER; VERCESI; BABABUNMI, 1978; ZAGO; CASTILHO; VERCESI, 2000).

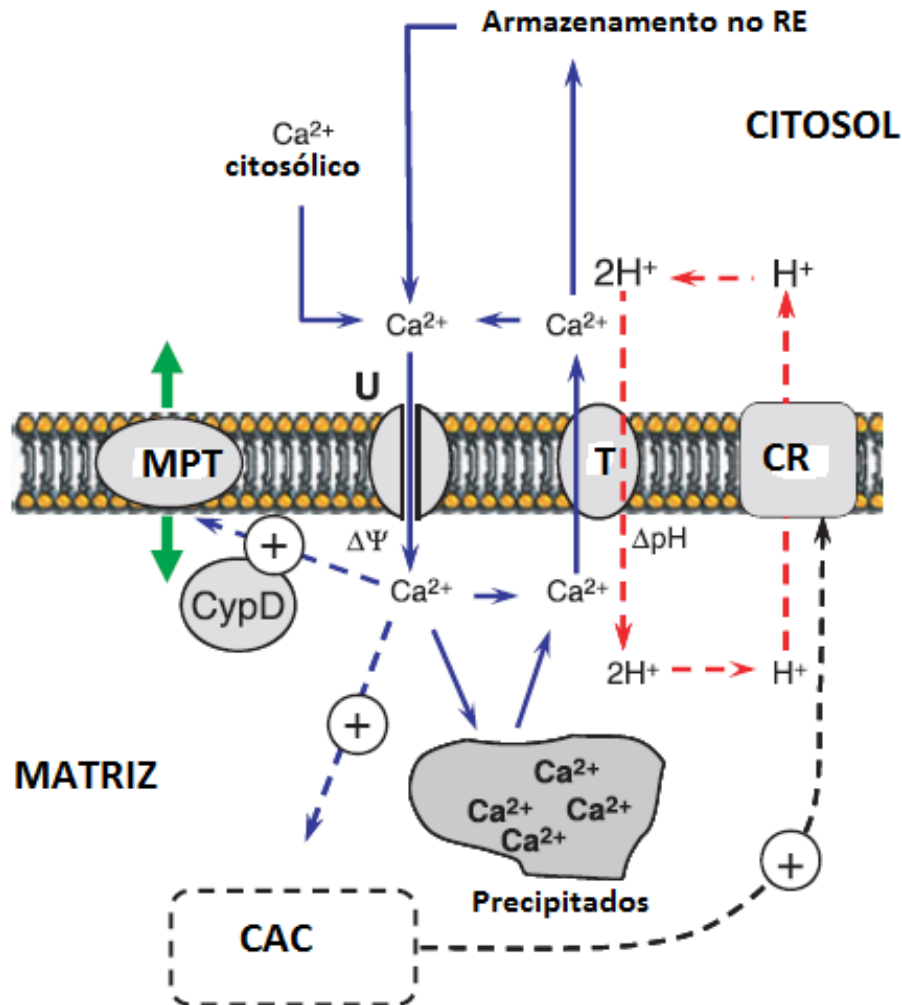


Figura 5. Modelo padrão da homeostase mitocondrial de Ca^{2+} . As mitocôndrias acumulam Ca^{2+} exógeno por meio do transportador eletrogênico (uniporte de Ca^{2+} , U) que facilita o transporte de Ca^{2+} através da membrana mitocondrial interna para a matriz. O transporte é acoplado ao acúmulo simultâneo de fosfato inorgânico (não mostrado). Dentro da matriz, o Ca^{2+} e o fosfato acumulados são estocados na forma de precipitados inativos osmoticamente, e eventualmente liberados de volta no citosol através do trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (não mostrado) e/ou $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$, que também estão localizados na membrana mitocondrial interna. O processo de captação de Ca^{2+} é direcionado pelo potencial de membrana mitocondrial; o processo de liberação de Ca^{2+} é direcionado pelo gradiente de pH, no caso do trocador $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$. Elevadas concentrações de Ca^{2+} intramitocondrial podem estimular as atividades das enzimas do ciclo do ácido cítrico (CAC), desse modo impulsionando a produção de energia na mitocôndria. Quando o acúmulo de Ca^{2+} ultrapassa um certo limiar, desencadeia-se a abertura do PTP, a qual também é modulada pela proteína localizada na matriz ciclofilina D (Cyp D). T: trocador; CR: cadeia respiratória (Adaptado de Starkov (2010)).

2. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos dos ácidos cis-5-tetradecenóico (Cis-5) e mirístico (Myr), principais ácidos graxos acumulados na VLCADD, sobre importantes funções mitocondriais no coração, fígado e músculo esquelético de ratos jovens, bem como em cardiomiócitos e hepatócitos cultivados, com a finalidade de esclarecer a patogênese do dano tecidual que acomete os pacientes afetados pela VLCADD, causando cardiomiopatia, insuficiência hepática e sintomas musculares esqueléticos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos do Cis-5 e Myr sobre a respiração celular (parâmetros respiratórios: estado 3, estado 4, estado desacoplado e razão de controle respiratório - RCR) e a produção de ATP em preparações mitocondriais de coração, fígado e músculo esquelético de ratos adolescentes;
- Investigar os efeitos do Cis-5 e Myr sobre a respiração mitocondrial (parâmetros respiratórios: estado 3, estado 4 e estado desacoplado) em fibras permeabilizadas de coração e de músculo esquelético de ratos adolescentes, bem como em cardiomiócitos (linhagem H9C2) e hepatócitos (linhagem HepG2) permeabilizados;
- Investigar os efeitos do Cis-5 e Myr sobre o potencial de membrana mitocondrial, conteúdo de NAD(P)H e capacidade de retenção de cálcio em preparações mitocondriais provenientes de coração, fígado e músculo esquelético de ratos adolescentes, bem como sobre o inchamento mitocondrial e a liberação de citocromo c por mitocôndrias de fígado, na presença de cálcio;

- Investigar os efeitos do Cis-5 e Myr sobre as atividades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons e das enzimas glutamato desidrogenase (GDH), malato desidrogenase (MDH), succinato desidrogenase (SDH), α -cetoglutarato desidrogenase (α -KGDH), isocitrato desidrogenase (IDH), citrato sintase (CS) e aspartato aminotransferase (AST) em preparações mitocondriais de coração, fígado e músculo esquelético de ratos adolescentes;
- Investigar os efeitos do Cis-5 e Myr sobre a fluidez de membrana em preparações mitocondriais de coração e fígado de ratos adolescentes.

PARTE II: Artigos Científicos

CAPÍTULO I

Metabolite accumulation in VLCAD deficiency markedly disrupts mitochondrial bioenergetics and Ca²⁺ homeostasis in the heart

Cristiane Cecatto, Alexandre Umpierrez Amaral, Janaína Camacho da Silva, Alessandro Wajner, Mariana de Oliveira Vargas Schimit, Lucas Henrique Rodrigues da Silva, Simone Magagnin Wajner, Ângela Zanatta, Roger Frigério Castilho e Moacir Wajner

Artigo científico publicado em
The FEBS Journal 285 (2018) 1437–1455

Metabolite accumulation in VLCAD deficiency markedly disrupts mitochondrial bioenergetics and Ca²⁺ homeostasis in the heart

Cristiane Cecatto¹, Alexandre Umpierrez Amaral^{1,2}, Janaína Camacho da Silva¹, Alessandro Wajner¹, Mariana de Oliveira Vargas Schimit¹, Lucas Henrique Rodrigues da Silva¹, Simone Magagnin Wajner³, Ângela Zanatta¹, Roger Frigério Castilho⁴ and Moacir Wajner^{1,5,6}

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2 Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, Brazil

3 Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

4 Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Brazil

5 Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

6 Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Keywords

cis-5-tetradecenoic acid; mitochondrial Ca²⁺ homeostasis; mitochondrial energy homeostasis; myristic acid; very long-chain acyl-CoA dehydrogenase

Correspondence

M. Wajner, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil
Fax: +55 51 3308 5540
Tel: +55 51 3308 5571
E-mail: mwajner@ufrgs.br

(Received 7 October 2017, revised 19 January 2018, accepted 20 February 2018)

doi:10.1111/febs.14419

We studied the effects of the major long-chain fatty acids accumulating in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency, namely *cis*-5-tetradecenoic acid (Cis-5) and myristic acid (Myr), on important mitochondrial functions in isolated mitochondria from cardiac fibers and cardiomyocytes of juvenile rats. Cis-5 and Myr at pathological concentrations markedly reduced mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), matrix NAD(P)H pool, Ca²⁺ retention capacity, ADP- (state 3) and carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazine-stimulated (uncoupled) respiration, and ATP generation. By contrast, these fatty acids increased resting (state 4) respiration (uncoupling effect) with the involvement of the adenine nucleotide translocator because carboxyatractyloside significantly attenuated the increased state 4 respiration provoked by Cis-5 and Myr. Furthermore, the classical inhibitors of mitochondrial permeability transition (MPT) pore cyclosporin A plus ADP, as well as the Ca²⁺ uptake blocker ruthenium red, fully prevented the Cis-5- and Myr-induced decrease in $\Delta\Psi_m$ in Ca²⁺-loaded mitochondria, suggesting, respectively, the induction of MPT pore opening and the contribution of Ca²⁺ toward these effects. The findings of the present study indicate that the major long-chain fatty acids that accumulate in VLCAD deficiency disrupt mitochondrial bioenergetics and Ca²⁺ homeostasis, acting as uncouplers and metabolic inhibitors of oxidative phosphorylation, as well as inducers of MPT pore opening, in the heart at pathological relevant concentrations. It is therefore presumed that a disturbance of bioenergetics and Ca²⁺ homeostasis may contribute to the cardiac manifestations observed in VLCAD deficiency.

Abbreviations

ANOVA, one-way analysis of variance; ANT, adenine nucleotide translocator; CI, complex I; CII, complex II; CAT, carboxyatractyloside; CCCP, carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazine; Cis-5, *cis*-5-tetradecenoic acid; CsA, cyclosporin A; DPC, diethyl pyrocarbonate; EtOH, ethanol; FAU, fluorescence arbitrary units; GDH, glutamate dehydrogenase; GSH, reduced glutathione; LCFA, long-chain fatty acids; LCHAD, long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; Mal, malonate; MDA, malondialdehyde; MDH, malate dehydrogenase; MPT, mitochondrial permeability transition; Myr, myristic acid; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PMG, pyruvate plus malate plus glutamate; RCR, respiratory control ratio; RR, ruthenium red; SDH, succinate dehydrogenase; SUIT, substrate-uncoupler inhibitor titration; VLCAD, very long-chain acyl-CoA dehydrogenase; $\Delta\Psi_m$, mitochondrial membrane potential.

Introduction

Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency (OMIM 609575) is the most frequent disorder of long-chain fatty acid (LCFA) β -oxidation, with an incidence of 1 : 50 000 to 1 : 100 000 in newborns [1,2]. It is biochemically characterized by the accumulation of LCFA and carnitine derivatives. Diagnosis is performed by tandem mass spectrometry in dried blood by elevation of C14 to C18 acylcarnitines, in which C14:1 (*cis*-5-tetradecenoylcarnitine) is considered as a disease-specific marker [3–5]. Although heterogeneous, the disorder is usually manifested by three clinical forms based on disease severity: (a) a severe, early-onset presentation with predominating cardiomyopathy with or without pericardial effusion leading to high mortality rates; (b) an infancy-onset hepatic phenotype with recurrent hypoketotic hypoglycemia; and (c) a late-onset, myopathic form with muscle weakness, myalgia, episodic myoglobinuria and rhabdomyolysis. The major cardiac manifestations include arrhythmia, conduction abnormalities, cardiomyopathy with or without pericardial effusion, and sudden death mainly induced by fasting, exercise, illness and fever [3,6–14]. VLCAD deficiency was included in newborn screening programs because of the life-threatening symptoms that can be prevented or attenuated by dietary regimens in a considerable number of patients [2,15].

Treatment for VLCAD deficiency is based on frequent meals and the avoidance of long fasting to prevent catabolism, as well as medium-chain triglyceride supplementation to provide the energy required by tissues that mainly consume fatty acids [2,16]. More recently, supplementation of triheptanoin to patients with fatty acid oxidation defects manifesting as cardiomyopathy and persistent myopathy has been proposed, with promising results being obtained, because this compound leads to synthesis of the ketones β -hydroxypentanoate and β -ketopentanoate, which, together with propionyl-CoA, serve as anaplerotic substrates [17,18], although the efficacy of this diet is still under investigation. The natural polyphenol resveratrol with antioxidant and anti-inflammatory properties was recently shown to be beneficial in human fibroblasts of patients with LCFA disorders [19]. Finally, bezafibrate was demonstrated to activate the peroxisome proliferator-activated receptor, leading to higher residual dehydrogenase activity and therefore restoring fatty acid oxidation capacities in fibroblasts of VLCAD-deficient patients [20].

With regard to the pathophysiology of mitochondrial LCFA β -oxidation disorders, the main current

hypothesis for the development of the severe clinical symptoms is attributed to energy deficiency as a result of the blockage of fatty acid oxidation and a low availability of glucose (hypoglycemia) and ketone bodies, especially during periods of fasting and illness [21]. However, more recently, the potential toxicity of very long-chain acylcarnitines was also proposed to play a role in the pathogenesis of this disease [16,22]. Therefore, it could be also considered that LCFA accumulating in this disorder may be cardiotoxic and important with respect to explaining the cardiomyopathy that affects patients, particularly during crises of metabolic decompensation in which the concentrations of these fatty acids increase dramatically. Noteworthy, morphological mitochondrial alterations in skeletal muscle detected by magnetic resonance imaging, as well as increased blood levels of creatine phosphokinase and lactic acid associated with episodic rhabdomyolysis, were found in VLCAD-deficient patients [23,24], suggesting a disturbance of mitochondrial energy homeostasis, although, to the best of our knowledge, ATP production was not measured in these patients. Similarly, there is evidence of bioenergetics disruption in the hearts of VLCAD-deficient mice, including a decrease in the phosphocreatine/ATP ratio [25], as well as the ATP pool [26], both associated with cardiac dysfunction in mice. In addition, we previously demonstrated that long-chain hydroxylated fatty acids accumulating in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency strongly disturb mitochondrial functions in various tissues [27–29]. Therefore, in the present study, we investigated the effects of *cis*-5-tetradecenoic (Cis-5; C14:1) and myristic (Myr; C14) acids at physiological ($\leq 10 \mu\text{M}$) and pathological concentrations (30–100 μM) [30] on important endpoints of mitochondrial function, including membrane potential ($\Delta\Psi_{\text{m}}$), matrix NAD(P)H content, Ca^{2+} retention capacity and ATP production in Ca^{2+} -unloaded and loaded mitochondrial preparations from the hearts of juvenile rats. The effects of these fatty acids on oxidative phosphorylation (OXPHOS) were also investigated by evaluating, ADP- (state 3), carbonyl cyanide 3-chlorophenyl hydrazine (CCCP)- (uncoupled) stimulated and resting (state 4) respiration, as well as some respiratory chain complexes and citric acid cycle enzyme activities, in mitochondria isolated from the heart. Some of these parameters were also measured in heart fibers and cardiomyocytes that reflect integrated cell systems and better mimic the cell milieu *in vivo*. Finally, we investigated whether Cis-5 and Myr could alter some important parameters of redox homeostasis.

Results

Myr and Cis-5 decrease $\Delta\Psi_m$ in heart mitochondria

We first assessed the effects of Myr (5–100 μM) and Cis-5 (1–100 μM) on $\Delta\Psi_m$ in state 4 (resting) respiring heart mitochondria before and after Ca^{2+} addition using glutamate plus malate as substrates. Myr and Cis-5 significantly decreased $\Delta\Psi_m$ in the absence of Ca^{2+} at 30 μM and higher concentrations in a dose-dependent manner, indicating an uncoupling effect. It was also observed that this effect was enhanced when mitochondrion was challenged by Ca^{2+} (Mir: $F_{5,18} = 51.410$, $P < 0.001$; Cis-5: $F_{5,18} = 151.912$, $P < 0.001$) (Fig. 1A,B). Interestingly, at physiological concentrations, both fatty acids were unable to change $\Delta\Psi_m$, highlighting their roles at the pathological concentrations found in the affected patients, particularly during metabolic decompensation. Furthermore, Myr- and Cis-5-induced mitochondrial depolarization in the presence of Ca^{2+} was prevented by ruthenium red (RR), which blocks mitochondrial Ca^{2+} uptake, as well as by the classical inhibitors of mitochondrial

permeability transition (MPT) cyclosporin A (CsA) plus ADP [Mir: $F_{5,23} = 28.212$, $P < 0.001$]; Cis-5: $F_{3,17} = 84.468$, $P < 0.001$) (Fig. 1C,D), indicating that these fatty acids elicit MPT in a mechanism dependent on the presence of Ca^{2+} . We also confirmed that the adenine nucleotide translocator (ANT) inhibitor carboxyatractyloside (CAT) totally prevented the Myr-induced uncoupling effect (decrease in $\Delta\Psi_m$ in a medium devoid of Ca^{2+}), in contrast to the potent reducing agent dithiothreitol that was unable to change $\Delta\Psi_m$ dissipation caused by Myr (Fig. 1C).

Myr and Cis-5 reduce mitochondrial matrix NAD(P)H content in heart mitochondria

Next, we evaluated the effects of Myr and Cis-5 on matrix NAD(P)H content in glutamate plus malate-supported heart mitochondria. We observed that both fatty acids induced a strong decrease in NAD(P)H levels in the absence of Ca^{2+} (Fig. 2). Furthermore, NAD(P)H levels were fully depleted after Ca^{2+} addition, suggesting that the reduced equivalents were oxidized or lost from the mitochondrial matrix.

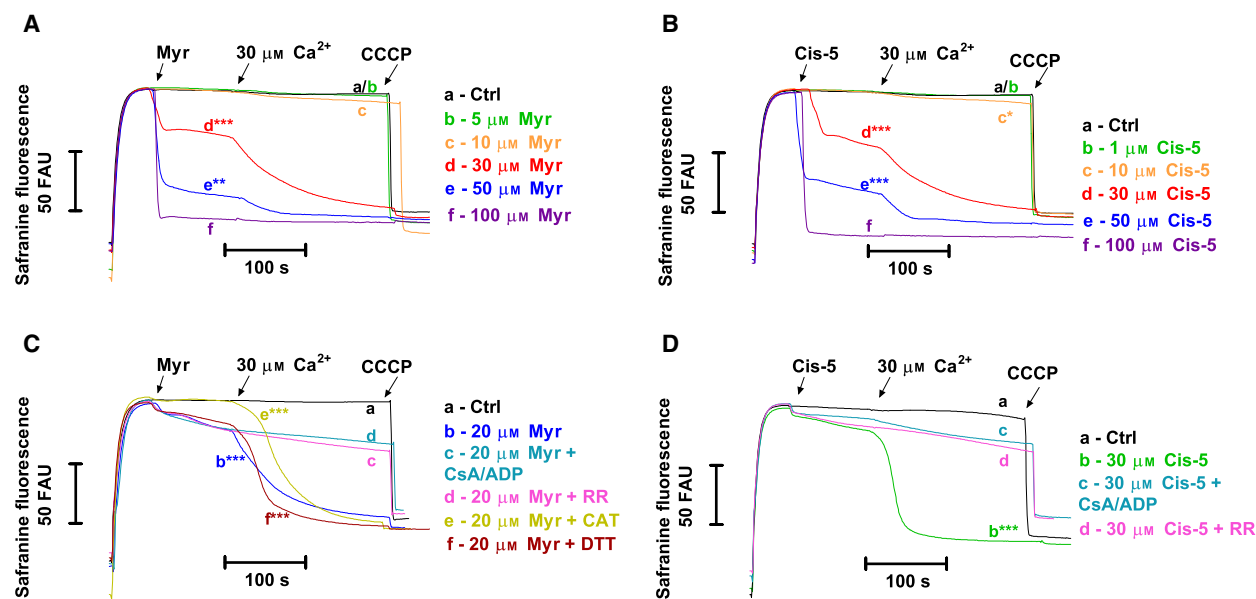


Fig. 1. Effects of Myr and Cis-5 acids on mitochondrial membrane potential in heart mitochondria. All experiments were performed in a reaction medium containing mitochondrial preparations ($0.35 \text{ mg protein}\cdot\text{mL}^{-1}$) supported by glutamate plus malate (2.5 mM each). (A) Myr (5–100 μM , lines b–f) or (B) Cis-5 (1–100 μM , lines b–f) were added 50 s after the beginning of the assay. (C) Myr (20 μM , lines b–f). (D) Cis-5 (30 μM , lines b–d). CsA (1 μM) plus ADP (300 μM) (line c), RR (1 μM , line d), CAT (1 μM , line e) or dithiothreitol (5 mM , line f) were added at the beginning of the assay. All panels refer to mitochondrial preparations before and after the addition of 30 μM Ca^{2+} , as indicated. Controls (lines a) were performed in the absence of fatty acids. CCCP was added at the end of the assays. Traces are representative of three independent experiments (N) and are expressed as FAU. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ compared to controls (Duncan's multiple range test).

Myr and Cis-5 decrease Ca²⁺ retention capacity in heart and skeletal muscle mitochondria

Because MPT induction may compromise mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and lead to release of this cation from the mitochondria, we determined the mitochondrial Ca²⁺ retention capacity in the presence of Myr (5–100 μM) and Cis-5 (1–100 μM) using glutamate plus malate as substrates. It can be seen in Fig. 3A,B that both fatty acids markedly reduced the mitochondrial Ca²⁺ retention capacity at concentrations of 30 μM and higher, whereas, at physiological concentrations, there was no effect at all. The results also suggest that the effect of Myr was stronger than that of Cis-5 (Fig. 3C). This was better observed when testing simultaneously the effects of 30 μM Myr and Cis-5 on Ca²⁺ retention capacity using a single Ca²⁺ addition (Fig. 3D). Finally, we tested whether Myr and Cis-5 could change this parameter in skeletal muscle. Both fatty acids were observed to decrease Ca²⁺ retention capacity at concentrations of 30 μM and higher with no change at physiological concentrations (Fig. 3E).

Myr and Cis-5 change oxygen consumption in heart mitochondria

Next, we studied the effects of Myr and Cis-5 on heart mitochondrial respiratory parameters measured by oxygen consumption using glutamate plus malate or succinate as substrates. Myr and Cis-5 (10–30 μM) significantly increased resting (state 4) ($F_{6,30} = 32.872$,

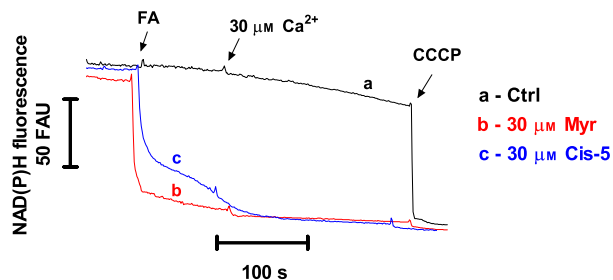


Fig. 2. Effects of Myr and Cis-5 acids on mitochondrial NAD(P)H content in heart mitochondria. All experiments were performed in a reaction medium containing mitochondrial preparations (0.35 mg protein·mL⁻¹) supported by glutamate plus malate (2.5 mM each). Myr or Cis-5 (30 μM, lines b–c) were added 50 s after the beginning of the assay. All traces refer to mitochondrial preparations before and after the addition of 30 μM Ca²⁺, as indicated. Controls (line a) were performed in the absence of fatty acids. CCCP was added at the end of the assays. Traces are representative of three independent experiments (N) and are expressed as FAU.

$P < 0.001$) (Fig. 4B), as well as decreased ADP-stimulated (state 3) ($F_{6,30} = 91.493$, $P < 0.001$) (Fig. 4A), CCCP-stimulated (uncoupled) respiration ($F_{6,30} = 27.280$, $P < 0.001$) (Fig. 4C) and respiratory control ratio (RCR) ($F_{6,30} = 359.787$, $P < 0.001$) (Fig. 4D), in a dose-dependent manner with glutamate plus malate as substrates.

Disturbance of mitochondrial respiration caused by Myr or Cis-5 was also observed in succinate-supported mitochondria but with less intense effects compared to glutamate plus malate [state 3 (ADP-stimulated): $F_{6,31} = 28.782$, $P < 0.001$; state 4 (resting): $F_{6,31} = 29.553$, $P < 0.001$; uncoupled (CCCP-stimulated) respiration: $F_{6,31} = 14.479$, $P < 0.001$; RCR: $F_{6,31} = 303.200$, $P < 0.001$] (Fig. 5A–D). It was also found that Myr-induced decrease in state 3 (ADP-stimulated) respiration supported by succinate was similar to that provoked by the classical succinate dehydrogenase (SDH) inhibitor malonate (Mal). Furthermore, Myr-induced inhibition was partially prevented by alamethicin that permeabilizes mitochondria (Fig. 5E). However, alamethicin was unable to change the metabolic inhibition caused by Mal (Fig. 5E). Taken together, it may be presumed that competition between Myr and succinate for the same mitochondrial membrane transporter is involved in the decrease in ADP-activated respiration by Myr ($F_{5,23} = 55.973$, $P < 0.001$) (Fig. 5E).

We also confirmed that Myr-induced increase in resting respiration (uncoupling behavior) was attenuated by the ANT inhibitor CAT ($F_{5,17} = 40.850$, $P < 0.001$) (Fig. 6A) but not by the UCP inhibitor GDP ($F_{4,19} = 16.943$, $P < 0.001$) (Fig. 6B) or the glutamate/aspartate antiporter inhibitor diethyl pyrocarbonate (DPC) ($F_{5,23} = 117.320$, $P < 0.001$) (Fig. 6C), suggesting a role for ANT in this effect.

Myr and Cis-5 significantly decrease complex I (CI) activity in mitochondrial preparations

Myr and Cis-5 markedly decreased CI activity ($F_{3,20} = 64.014$, $P < 0.001$) (Fig. 7A), whereas complex II (CII) activity was not changed by these compounds (Fig. 7B), implying a selective inhibitory effect on CI activity. These results may be partly related to the significant metabolic inhibition provoked by these LCFA on mitochondrial respiration measured by oxygen consumption when glutamate plus malate rather than succinate was used as a mitochondrial respiring substrate. By contrast, Myr and Cis-5 did not alter glutamate dehydrogenase (GDH), SDH and malate dehydrogenase (MDH) activities, indicating that GDH and citric acid cycle inhibition were not involved in the Myr and

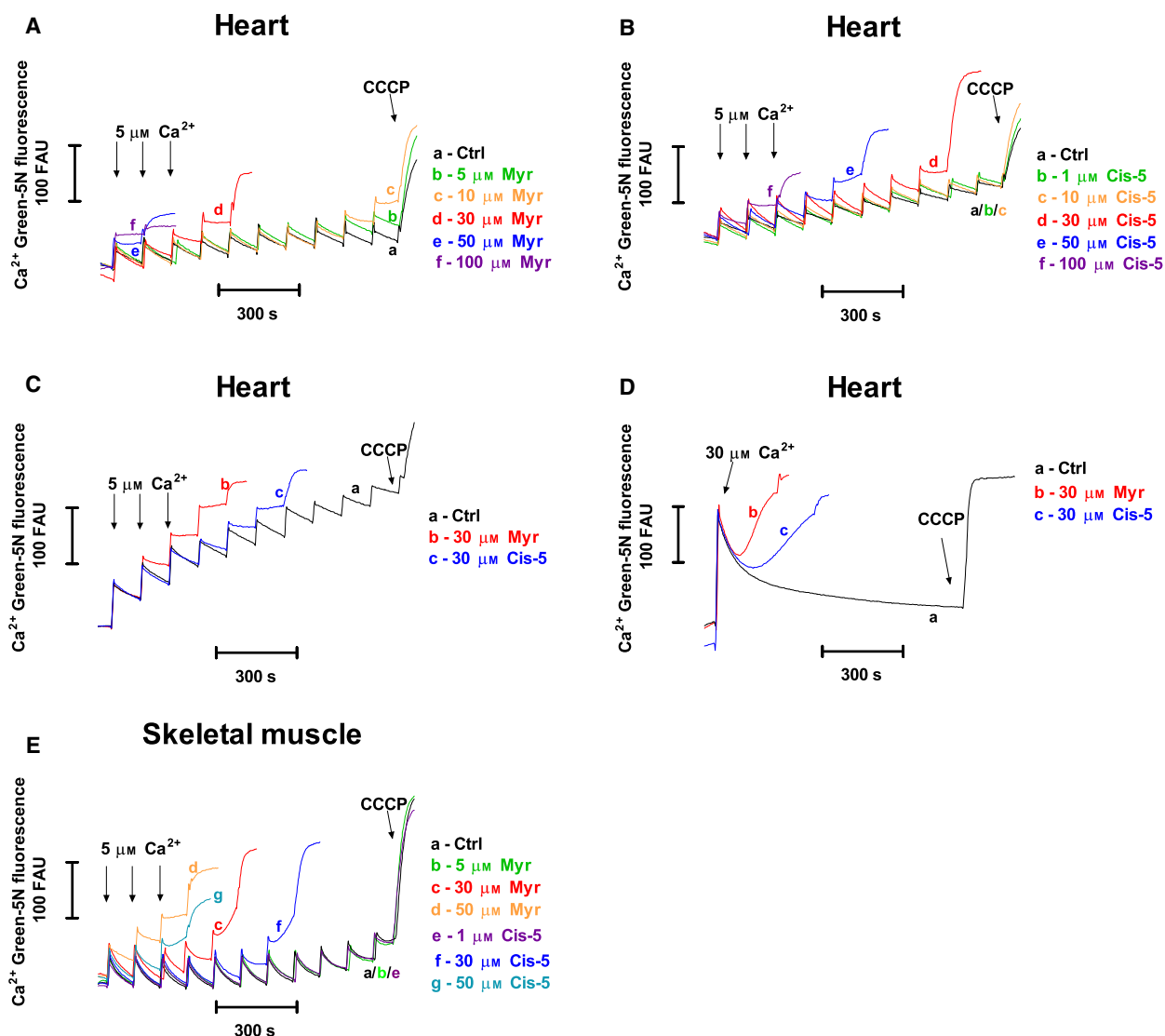


Fig. 3. Effects of Myr and Cis-5 acids on mitochondrial Ca^{2+} retention capacity in Ca^{2+} -loaded heart and skeletal muscle mitochondria. All experiments were performed in a reaction medium containing mitochondrial preparations ($0.35 \text{ mg protein}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Heart: A, B, C and D; skeletal muscle: E) supported by glutamate plus malate (2.5 mM each). The fatty acids were added at the beginning of the assays. (A) Myr ($5\text{--}100 \mu\text{M}$, lines b–f). (B) Cis-5 ($1\text{--}100 \mu\text{M}$, lines b–f). (C, D) Myr or Cis-5 ($30 \mu\text{M}$, lines b, c). (E) Myr ($5\text{--}50 \mu\text{M}$, lines b–d) or Cis-5 ($1\text{--}50 \mu\text{M}$, lines e–g). (D) Single addition of $30 \mu\text{M}$ Ca^{2+} . In (A), (B), (C) and (E), mitochondrial preparations were supplemented by successive additions of $5 \mu\text{M}$ Ca^{2+} every 2 min, as indicated by the arrows. Controls (line a) were performed in the absence of these fatty acids. CCCP was added at the end of the assays. Traces are representative of three independent experiments (N) and are expressed as FAU.

Cis-5-induced decrease in mitochondrial oxygen consumption (Table 1).

Myr and Cis-5 do not change mitochondrial membrane fluidity

Myr and Cis-5 might also interact with mitochondrial membrane lipids, altering fluidity and therefore interfering with some of the parameters examined in the

present study, such as the uncoupling effect, induction of MPT and the decrease in CI activity of the respiratory chain. We therefore evaluated the fluidity of mitochondrial membranes by measuring fluorescence anisotropy (r) in the presence of Myr and Cis-5. Triton X-100 was used as a positive control as a result of its strong detergent activity. We observed that both fatty acids did not change this parameter ($F_{3,15} = 21.675$, $P < 0.001$) (Fig. 8), implying that

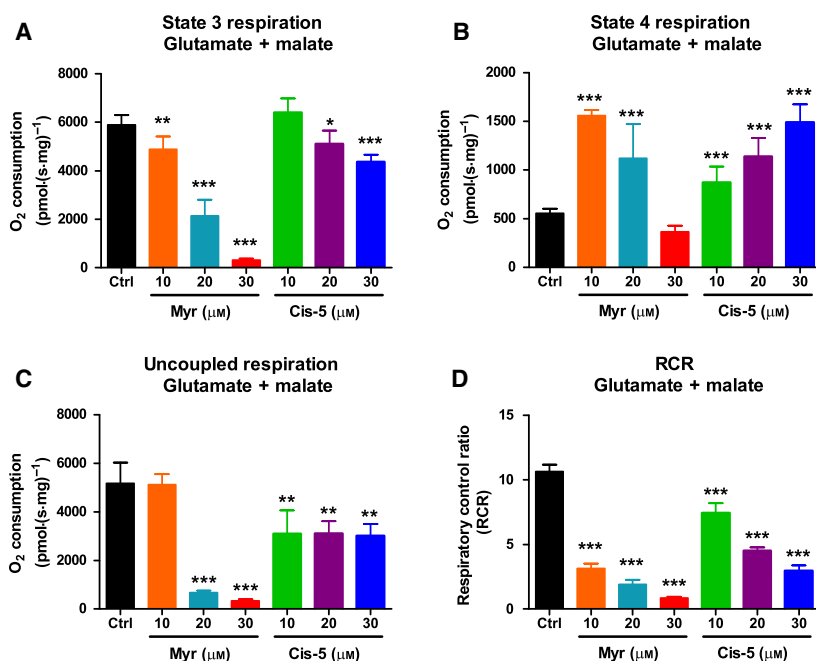


Fig. 4. Effects of Myr and Cis-5 acids on respiratory parameters measured by oxygen consumption in glutamate/malate-supported heart mitochondria. (A) State 3 (ADP-stimulated), (B) state 4 (resting), (C) uncoupled (CCCP-stimulated) respiration and (D) respiratory control ratio (RCR). Glutamate plus malate (2.5 mM each) were used as substrates. Mitochondrial preparations (0.1 mg protein·mL⁻¹) and Myr or Cis-5 (10–30 μM) were added to the incubation medium at the beginning of the assays. Controls were performed in the absence of fatty acids. Values are the mean \pm SD of three to four independent experiments (N) and are expressed as pmol O₂·s⁻¹·(mg protein)⁻¹. * P < 0.05, ** P < 0.01 and *** P < 0.001 compared to controls (Duncan's multiple range test).

destabilization of mitochondrial membranes by interaction of these fatty acids with membrane phospholipids was not involved in the deleterious effects provoked by these fatty acids on mitochondrial functions.

Myr and Cis-5 decrease ATP production by heart mitochondria

We also tested whether Myr and Cis-5 could alter ATP production in heart mitochondrial preparations. Myr and Cis-5 markedly decreased ATP production ($F_{5,23} = 55.431$, $P < 0.001$) (Fig. 9), reflecting a severe disruption of mitochondrial energy production at a magnitude similar to the ATP synthase inhibitor oligomycin.

Myr and Cis-5 decrease oxygen consumption in heart mitochondria using a substrate-uncoupler inhibitor titration (SUIT) protocol

To further evaluate the effects of Myr and Cis-5 on heart mitochondrial respiration, we assessed the respiratory parameters using a SUIT protocol that allows sequential testing of different substrate and coupling states. A concentration of 10 μM Myr was sufficient to markedly decrease state 3 ($F_{2,16} = 16.263$, $P < 0.001$) (Fig. 10A) that reflects OXPHOS capacity using a combination of NADH-linked substrates [pyruvate plus malate plus glutamate (PMG)]. The presence of succinate as the respiratory substrate also significantly

minimized Myr-induced effects ($F_{2,16} = 5.543$, $P < 0.05$) (Fig. 10B), corroborating the previous results demonstrating that this fatty acid is more deleterious to heart respiring mitochondria with NADH-linked substrates. Furthermore, uncoupled respiration indicates that the electron transfer system capacity was also decreased with all substrates (PGM plus succinate) ($F_{2,16} = 3.000$, $P < 0.05$) (Fig. 10C). Finally, 10 μM Cis-5 provoked no significant effects.

Myr decreases ADP- and CCCP-stimulated respiration in cardiac muscle fibers and cardiomyocytes

To analyze the effects provoked by Myr and Cis-5 on mitochondrial functions *in situ*, we first tested the influence of these fatty acids (10 μM) on mitochondrial respiration using permeabilized cardiac muscle fibers (saponin). We found that Myr and Cis-5 strongly decreased oxygen consumption in a cocktail substrate-supported medium (glutamate, malate, pyruvate and succinate) stimulated by ADP (state 3) ($F_{2,23} = 22.465$, $P < 0.001$) (Fig. 11A) or by CCCP (uncoupled state) ($F_{2,23} = 16.029$, $P < 0.001$) (Fig. 11B).

We also evaluated various respiratory parameters (state 3, state 4 and uncoupled respiration) measured by oxygen consumption in permeabilized cardiomyocytes (digitonin). Myr and Cis-5 (50 μM) strongly inhibited state 3 and uncoupled respiration in heart cells supported by glutamate plus malate. Furthermore, resting respiration was increased by both fatty

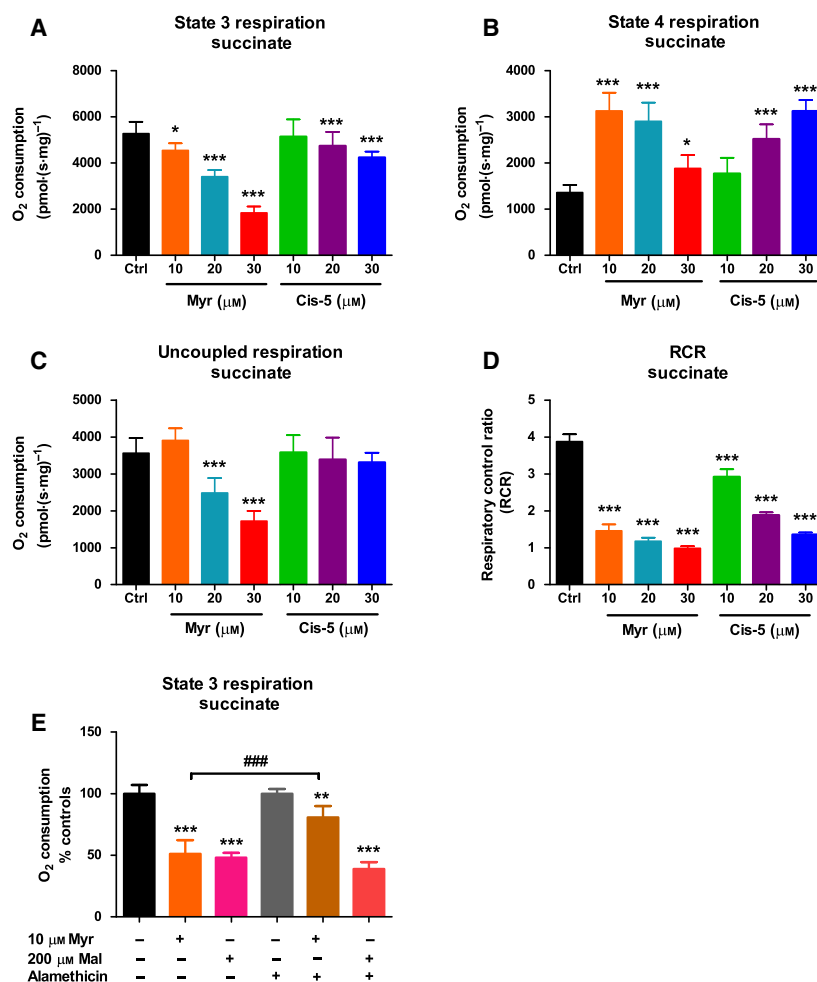


Fig. 5. Effects of Myr and Cis-5 acids on respiratory parameters measured by oxygen consumption in succinate-supported heart mitochondria. (A, E) State 3 (ADP-stimulated), (B) state 4 (resting), (C) uncoupled (CCCP-stimulated) respiration and (D) RCR. Succinate (5.0 mM) was used as substrate. Mitochondrial preparations (0.1 mg protein·mL $^{-1}$) supplemented by Myr or Cis-5 (10–30 μM) were added to the incubation medium at the beginning of the assays. In some experiments, we used Mal (200 μM) or alamethicin (40 $\mu\text{g}\cdot(\text{mg protein})^{-1}$) in the assay. Controls were performed in the absence of fatty acids. Values are the mean \pm SD of three to four independent experiments (N) and are expressed as pmol $\text{O}_2\cdot\text{s}^{-1}\cdot(\text{mg protein})^{-1}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to controls. ### $P < 0.001$ compared to 10 μM Myr (Duncan's multiple range test).

acids in cultured cardiomyocytes (Fig. 12). The data strongly indicate that these fatty acids behave as metabolic inhibitors in integrated heart cell systems, corroborating our data obtained using mitochondrial preparations.

Myr and Cis-5 do not alter redox homeostasis in the heart

Finally, Myr and Cis-5 at concentrations as high as 100 μM were unable to provoke lipid peroxidation, as determined by malondialdehyde (MDA) levels, or decrease the antioxidant defenses, as measured by reduced glutathione (GSH) levels (Table 2).

Discussion

Energy production from LCFA is severely impaired in VLCAD deficiency. In this regard, clinical features usually develop during episodes of illness or fasting and affect those tissues using LCFA as the primary

energy source, such as the heart, liver and skeletal muscle [31]. Patients with VLCAD deficiency usually present severe cardiac manifestations, in which energy deprivation was postulated to play an important role [32]. However, the precise underlying mechanisms of the potentially lethal cardiomyopathy are still poorly established. During crises of metabolic decompensation, there is a large increase in the concentrations of the accumulating metabolites, particularly LCFA and their carnitine derivatives. Furthermore, high levels of these endogenous compounds during these episodes [7,8,33] are associated with a worsening of the symptoms and, more specifically, with cardiac arrhythmias and cardiomyopathy, which can be prevented or attenuated in many patients by early appropriate therapeutic measures, including restriction of LCFA [2,34–36], suggesting that the long-chain acyl-CoA esters and/or LCFA may be cardiotoxic and contribute to the cardiomyopathy in this disorder [37]. This hypothesis is supported by a previous study reporting that the monounsaturated fatty acids, such as *cis*-9-tetradecenoic

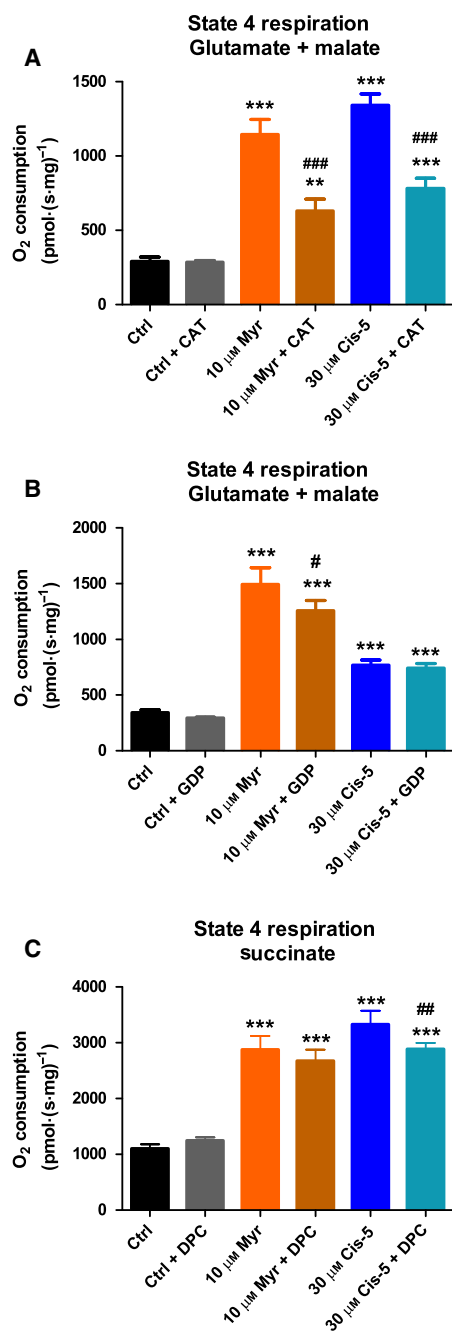


Fig. 6. Effects of Myr and Cis-5 acids on resting (state 4) respiration in the presence of (A) CAT (30 μM), (B) GDP (200 μM) or (C) DPC (100 μM) in heart mitochondria. Glutamate plus malate (2.5 mM each) or succinate (5.0 mM) were used as substrates. Mitochondrial preparations (0.1 mg protein·mL⁻¹) and Myr (10 μM) or Cis-5 (30 μM) were added to the incubation medium at the beginning of the assays. Controls were performed in the absence of fatty acids. Values are the mean ± SD of three to four independent experiments (N) and are expressed as pmol O₂·s⁻¹·(mg protein)⁻¹. ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 compared to controls; #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01 and ###*P* < 0.001 compared to Myr or Cis-5 (Duncan's multiple range test).

and *cis*-9-hexadecenoic acids, but not shorter- or longer carbon-chain fatty acids, disrupt $\Delta\Psi_m$, leading to apoptosis and necrosis of cultured cardiomyocytes [38]. Otherwise, although expanded newborn screening and early treatment decreases mortality and morbidity in most children with VLCAD deficiency, episodes with severe cardiac manifestations cannot be fully prevented in many cases, raising questions about the effectiveness of the present therapy, as well the need for further investigations into the pathogenesis of this disorder [39]. In this context, some observations suggest that impaired mitochondrial energy homeostasis may contribute decisively to the pathophysiology of this disease. These include mitochondrial morphological alterations, rhabdomyolysis and lactic acidemia, which were reported in some affected patients [4,23,24,40], as well as the disruption of mitochondrial bioenergetics in tissues from the genetic animal model with VLCAD deficiency [25,41]. However, the effects of the major accumulating fatty acids, especially Cis-5, which is the biochemical hallmark for the diagnosis of VLCAD deficiency [5], on critical mitochondrial functions had not yet been investigated and were the focus of our attention in the present study.

Therefore, we evaluated the role of Cis-5 and Myr at physiological and pathological concentrations on a large spectrum of mitochondrial bioenergetics measurements and on Ca²⁺ homeostasis in the heart of juvenile rats with the aim of testing whether mitotoxicity could be a contributing factor to cardiac damage in this disease.

Overall, we demonstrated that Cis-5 and Myr significantly compromised bioenergetics by behaving as uncouplers, metabolic inhibitors and MPT inducers in mitochondria isolated from the heart and cardiac muscle fibers of rats. Both fatty acids markedly reduced ATP production, reflecting their severe effects on myocardium bioenergetics. Cis-5 and Myr also impaired mitochondrial Ca²⁺ retention capacity, which represents an important function of mitochondria [42–46], especially with respect to controlling Ca²⁺ homeostasis in the heart, constituting an important regulatory mechanism of cardiac physiology needed for the normal functioning of cardiomyocytes [47].

Our experiments also revealed that Cis-5 and Myr markedly dissipated $\Delta\Psi_m$ in a medium devoid of Ca²⁺, which may possibly be attributed to an uncoupling effect or, alternatively, to a metabolic inhibition. Furthermore, Cis-5- and Myr-induced $\Delta\Psi_m$ dissipation was magnified in Ca²⁺-loaded heart mitochondria and fully prevented by RR, a known inhibitor of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter [48], as well as by CsA plus ADP [49,50]. Because CsA inhibits MPT by

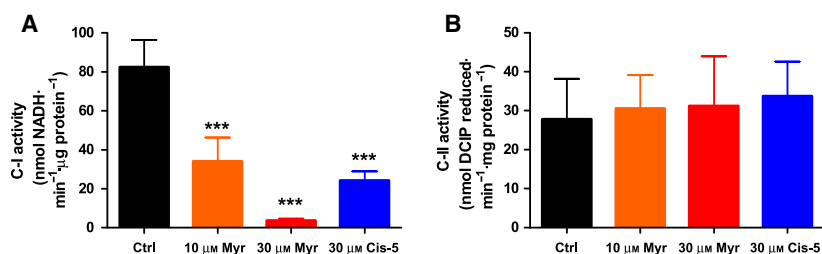


Fig. 7. Effects of Myr and Cis-5 acids on the respiratory chain CI (A) and CII (B) activities in heart mitochondria. Mitochondrial preparations and Myr (10–30 μ M) or Cis-5 (30 μ M) were pre-incubated for 30 min. Values are the mean \pm SD of four to six independent experiments (animals) performed in triplicate and expressed as nmol NADH oxidized·min⁻¹·(mg protein)⁻¹ (A) and as nmol DCIP reduced·min⁻¹·(mg protein)⁻¹ (B). *** P < 0.001 compared to controls (Duncan's multiple range test).

Table 1. Effects of Myr and Cis-5 acids on the activities of GDH, SDH and MDH in heart mitochondria. Mitochondrial preparations and Myr (10–30 μ M) or Cis-5 (30 μ M) were pre-incubated for 30 min. Values are the mean \pm SD of three to six independent experiments (animals) performed in triplicate and expressed as nmol NADH·min⁻¹·(mg protein)⁻¹ (GDH), nmol DCIP reduced·min⁻¹·(mg protein)⁻¹ (SDH) and μ mol NAD·min⁻¹·(mg protein)⁻¹ (MDH). No significant differences were detected (one-way ANOVA).

	Control	10 μ M Myr	30 μ M Myr	30 μ M Cis-5
GDH	17.7 \pm 2.7	18.9 \pm 2.8	19.7 \pm 3.9	17.6 \pm 2.5
SDH	50.4 \pm 10.8	44.2 \pm 15.3	54.1 \pm 14.8	43.5 \pm 5.5
MDH	28.4 \pm 5.3	27.8 \pm 5.5	25.0 \pm 4.7	29.4 \pm 7.5

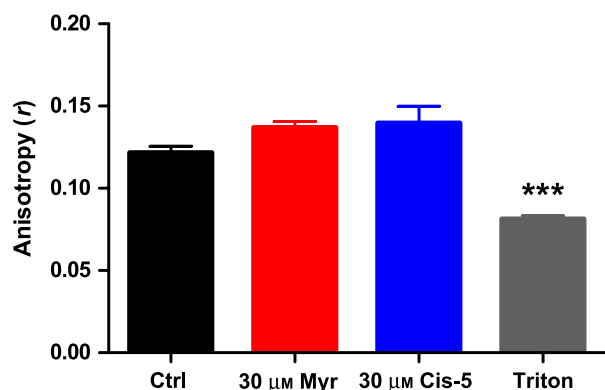


Fig. 8. Effects of Myr and Cis-5 acids on mitochondrial membrane fluidity in heart mitochondria. Glutamate plus malate (2.5 mM each) were used as substrates. Mitochondrial preparations (0.1 mg protein·mL⁻¹) and Myr or Cis-5 (30 μ M) were added to the incubation medium at the beginning of the assays. Triton X-100 (0.1%) was also used as a positive control. Controls were performed in the absence of fatty acids. Values are the mean \pm SD of four independent experiments (N) and are expressed as fluorescence anisotropy (r). *** P < 0.001 compared to controls (Duncan's multiple range test).

inactivating cyclophilin D, a mitochondrial matrix protein associated with MPT occurrence [51–54], whereas ADP binds to the ANT in the mitochondrial matrix

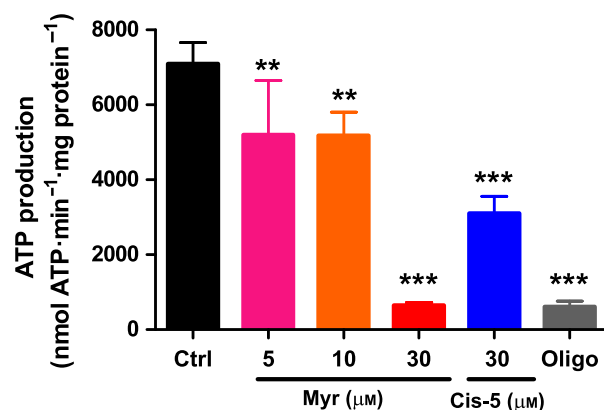


Fig. 9. Effects of Myr and Cis-5 acids on ATP production in heart mitochondria. All experiments were performed in a reaction medium containing heart mitochondrial preparations (0.1 mg protein·mL⁻¹) supported by glutamate plus malate (2.5 mM each). Myr (5–30 μ M) or Cis-5 (30 μ M) were added at the beginning of the assay. Controls were performed in the absence of fatty acids. Oligomycin A (Oligo) (1 μ g·mL⁻¹) was used as a positive control. Values are the mean \pm SD of six independent experiments (animals) and are expressed as nmol ATP·min⁻¹·(mg protein)⁻¹. ** P < 0.01 and *** P < 0.001 compared to controls (Duncan's multiple range test).

side inhibiting MPT [49,50], these data indicate that Cis-5 and Myr induce MPT pore opening. On the other hand, it is unlikely that oxidative damage to pore proteins as a result of reactive species attack could explain Myr- and Cis-5-induced MPT in Ca²⁺-loaded mitochondria because, at high concentrations (100 μ M), these fatty acids were unable to provoke oxidative stress determined by MDA and GSH levels. This assumption is reinforced by the observations that the potent reducing agent dithiothreitol was unable to prevent Myr-elicited MPT. Furthermore, a change of mitochondrial membrane fluidity that can be associated with MPT induction [55,56] is also unlikely because mitochondrial membrane anisotropy was not changed by Myr and Cis-5. Our present data

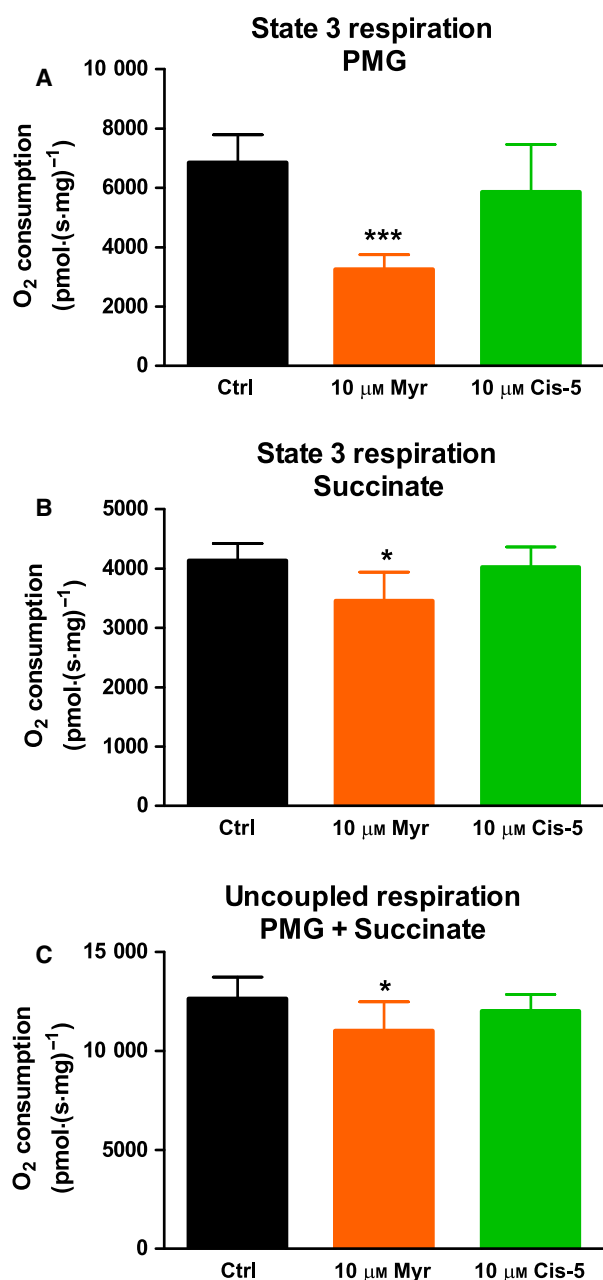


Fig. 10. Effects of Myr and Cis-5 acids on respiratory parameters measured by oxygen consumption in heart mitochondria using the SUIT protocol. (A) CI-linked state 3 (ADP-stimulated), (B) CII-linked state 3 (ADP-stimulated) and (C) CI&II-linked uncoupled (CCCP-stimulated) respiration. Pyruvate (5 mM), malate (0.5 mM) plus glutamate (10 mM) (PMG) and succinate (SUC) (10 mM) were used as substrates. Mitochondrial preparations (0.1 mg protein·mL⁻¹) and Myr or Cis-5 (10 μM) were added to the incubation medium at the beginning of the assays. Controls were performed in the absence of fatty acids. Values are the mean ± SD of five to seven independent experiments (N) and are expressed as pmol O₂·s⁻¹·(mg protein)⁻¹. **P* < 0.05 and ****P* < 0.001 compared to controls (Duncan's multiple range test).

on the heart are in agreement with previous results showing that Myr also provokes MPT induction in liver mitochondrial preparations [57,58]. However, so far, nothing has been reported about the effects of Cis-5 on these parameters in the heart or in any other tissue.

We cannot rule out that MPT activation could be involved in the decrease in Ca²⁺ retention capacity in Ca²⁺-loaded heart mitochondria because this condition is shown to induce loss of mitochondrial elements (Ca²⁺, Mg²⁺, glutathione, NADH and NADPH), resulting in an impairment of OXPHOS [59–61].

Other findings of the present study revealed that Cis-5 disturbed mitochondrial respiration by increasing resting (state 4) respiration and decreasing RCR, which, allied to the Cis-5-induced nondependent Ca²⁺ ΔΨ_m dissipation, is indicative of an uncoupler effect of Cis-5 on OXPHOS. Similar results were obtained with Myr, and this is in accordance with previous studies carried out in the liver and heart [62,63].

ANT was probably involved in the uncoupling behavior of Cis-5 and Myr because CAT attenuated the Cis-5 and Myr-induced increase in state 4 respiration and ΔΨ_m dissipation [64–66]. By contrast, UCP proteins and the glutamate/aspartate antiporter were not responsible for the uncoupling behavior caused by Myr and Cis-5 once the respective inhibitors GDP and DPC were unable to significantly alter this effect [67–69]. Thus, it is assumed that the uncoupling effect on OXPHOS could be a result of a protonophoric mechanism with a transbilayer movement of undissociated (linked to protons) Cis-5 and Myr through the mitochondrial inner membrane that is facilitated by ANT [70–72], which is in accordance with previous data on the effects of Myr [73,74]. Finally, we cannot rule out that this uncoupling effect may also have occurred at least in part through the movement of Myr and Cis-5 towards the mitochondrial matrix by other transporters, such as the mono- and tri-carboxylate [75] and the phosphate carriers [76].

Cis-5 and Myr also caused a significant dose-dependent decrease in ADP- and CCCP-stimulated respiration, markedly decreasing ATP synthesis. These data reflect a strong metabolic inhibition caused by these LCFA. Considering that ANT activity is fundamental for ATP production and therefore ADP-stimulated (state 3) respiration, it is suggested that the interaction of these fatty acids with ANT may be involved in their deleterious effects compromising heart bioenergetics. It is also of note that the Cis-5- and Myr-induced decrease in state 3 and uncoupled respiration was higher using NADH (pyruvate, malate and glutamate)

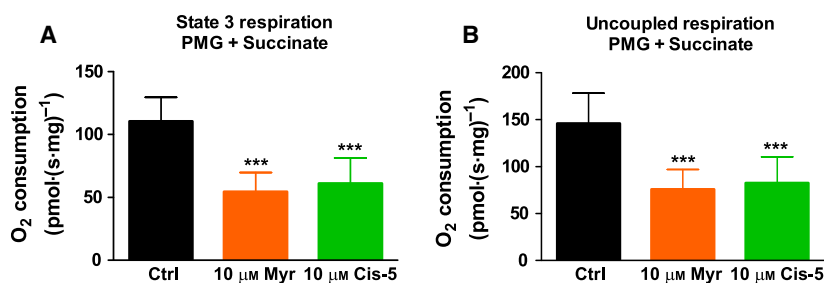


Fig. 11. Effects of Myr and Cis-5 acids on respiratory parameters measured by oxygen consumption in permeabilized myocardial fibers. (A) CI&II-linked state 3 (ADP-stimulated) and (B) CI&II-linked uncoupled (CCCP-stimulated) respiration. Pyruvate (5 mM), malate (5 mM) plus glutamate (10 mM) (PMG) and succinate (SUC) (10 mM) were used as substrates. Approximately 6 mg of permeabilized myocardial fibers and Myr or Cis-5 (10 μM) were added to the incubation medium at the beginning of the assays. Controls were performed in the absence of fatty acids. Values are the mean \pm SD of eight to nine independent experiments (N) and are expressed as $\text{pmol O}_2\text{-s}^{-1}\cdot\text{mg tissue}^{-1}$. *** $P < 0.001$ compared to controls (Duncan's multiple range test).

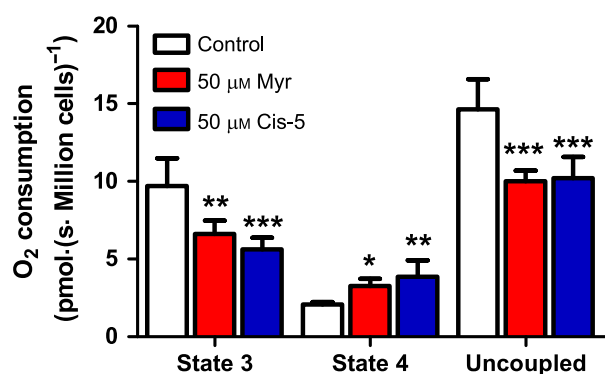


Fig. 12. Effects of Myr and Cis-5 acids on respiratory parameters measured by oxygen consumption in cardiac cells. Glutamate (10 mM) plus malate (5 mM) were used as substrates. Digitonin (5 μM) was used to permeabilize cardiac cells. Approximately 3 million cells and Myr and Cis-5 (50 μM) were added to 2 mL of the incubation medium at the beginning of the assays. Controls were performed in the absence of fatty acids. Values are the mean \pm SD of five independent experiments (N) calculated and expressed as $\text{pmol O}_2\text{-s}^{-1}\cdot\text{million cells}^{-1}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to controls (Duncan's multiple range test).

Table 2. Effects of Myr and Cis-5 acids on MDA concentrations and GSH levels in the heart. Values are the mean \pm SD of five to seven independent experiments (animals) and are expressed as a percentage of controls. No significant differences were detected (one-way ANOVA).

	Control	100 μM Myr	100 μM Cis-5
MDA	100 \pm 23.2	104.0 \pm 23.7	97.5 \pm 18.5
GSH	100 \pm 23.9	86.3 \pm 19.9	124.3 \pm 31.1

compared to FADH_2 (succinate)-linked substrates in heart mitochondria. These results could partly be attributed to the strong and selective decrease in CI

activity caused by Cis-5 and Myr, with no alteration of CII through which succinate releases its electrons. Furthermore, GDH, SDH and MDH activities were not inhibited by these fatty acids, implying that oxidation of glutamate and citric acid cycle impairment were not involved in Cis-5 and Myr-induced metabolic inhibition. Other observations showing no Myr-induced decrease in ADP-stimulated respiration in succinate-supported mitochondria permeabilized by alamethicin-mitochondria suggest competition between Myr and succinate for the mitochondrial dicarboxylate carrier, similar to that reported previously in the liver [77].

Mitochondrial matrix NAD(P)H content was also strongly decreased by Cis-5 and Myr in a medium devoid of Ca^{2+} . It is unlikely that the reduction of NAD(P)H occurred via oxidation of the reducing equivalents provoked by reactive species because these fatty acids did not give rise to oxidative stress in the heart. More likely, the reduction of NAD(P)H was a result of the uncoupling behavior of these fatty acids.

Our *in vitro* results achieved in mitochondrial preparations were confirmed by an *in situ* approach performed with intact cell systems consisting of heart fibers and cardiac cells that reliably evaluate mitochondrial functionality within an integrated cellular system [78]. We observed that Cis-5 and Myr severely disturbed heart bioenergetics in cardiac fibers and cardiomyocytes, causing a marked inhibition of oxygen consumption in state 3 and uncoupled respiration.

Notably, the present study highlights the important antioxidant role of the mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase as a result of its ability to regenerate NADPH from NADH (forward mode) [79]. Furthermore, energy deprivation leads to a decrease in the NADH/NAD ratio, reversing the normal direction of this enzyme activity in the heart, consuming NADPH

to form NADH (reverse mode) to support energy metabolism [80] and indirectly favoring MPT pore opening. Accordingly, we cannot exclude the possibility that, under conditions of mitochondrial dysfunction, depletion of NADPH caused by the reverse mode of nicotinamide nucleotide transhydrogenase may potentially induce MPT that is usually triggered by oxidative stress, therefore aggravating the mitochondrial dysfunction caused by Myr and Cis-5. In addition, because uncouplers commonly provoke NADH oxidation, we cannot rule out the possibility that the uncoupling effect of Myr and Cis-5 may also change nicotinamide nucleotide transhydrogenase activity to the reverse mode and its associated harmful consequences.

It is difficult to establish the pathophysiological relevance of our present data because the concentrations of Cis-5 and Myr in the heart of VLCAD-deficient patients are still unknown. However, it should be noted that the mitotoxic effects demonstrated in the present study were achieved with pathological concentrations of accumulating fatty acids similar to those found in the plasma of the affected patients during metabolic decompensation [30], indicating a high vulnerability of heart to the toxicity of these metabolites. Importantly, Myr and Cis-5 were unable to change the evaluated parameters at physiological levels, reinforcing their actions only at pathological concentrations. Furthermore, it is worth noting that the heart mainly utilizes fatty acids for its energy needs, such that the enzymatic fatty acid oxidation steps, including the catabolism of LCFA, are highly expressed in this tissue [21,81]. The present data therefore reinforce the hypothesis that an accumulation of LCFA disturbs crucial mitochondrial functions and may be involved in the clinical phenotype characteristically found in patients affected by VLCAD deficiency. Finally, it is also feasible that the disruption of mitochondrial functions caused by Myr and Cis-5 may be further intensified *in vivo* under stress conditions (e.g. during episodes of metabolic decompensation) in patients affected by VLCAD deficiency.

In conclusion, we provide, for the first time, solid evidence indicating that, at pathological concentrations, Cis-5, which is the principal biochemical marker used for the diagnosis of VLCAD deficiency, markedly disrupts heart mitochondrial energy and Ca^{2+} homeostasis, behaving as a potent metabolic inhibitor, uncoupler and MPT inducer, severely compromising OXPHOS in cardiac muscle from juvenile rats. We also demonstrate that Myr induced a significant decrease in mitochondrial NAD(P)H content and Ca^{2+} retention capacity in mitochondrial preparations, which has not been reported previously. Our *in vitro* data obtained in mitochondrial fractions were confirmed in integrated cell systems

(cardiac fibers and cardiomyocytes) that better mimic the cell milieu *in vivo*. Finally, we confirmed the previous deleterious effects of Myr on some parameters of mitochondrial bioenergetics (mitochondrial respiration and $\Delta\Psi_m$). We propose that the mitotoxicity caused by fatty acids accumulating the most in VLCAD deficiency may possibly be associated with the lactic acidemia observed in some affected patients and the disturbance of mitochondrial bioenergetics found in the genetic knockout animal model of VLCAD deficiency [4,23–25,41]. It is tempting to speculate that the findings of the present study may be associated with the cardiac manifestations occurring in patients affected by VLCAD deficiency, especially during metabolic crises, which are biochemically characterized by a dramatic increase in accumulating fatty acids. Finally, because Myr and Cis-5 also disturbed skeletal muscle bioenergetics, it could be presumed that mitochondrial dysfunction may contribute towards explaining the lactic acidemia, muscle weakness and severe episodes of rhabdomyolysis observed in patients affected by VLCAD deficiency. Further studies investigating the role of long-chain acylcarnitines and acyl-CoA derivatives found at high concentrations in the blood on mitochondrial homeostasis appear to be justified with respect to shedding more light on the pathophysiology of this disease.

Materials and methods

Reagents

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), except Cis-5, which was synthesized by Dr Ernesto Brunet (Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, Spain). Stock solutions of Cis-5 and Myr were prepared in ethanol (EtOH). Final concentrations of Myr and Cis-5 in the incubation medium were in the ranges 5–100 μM and 1–100 μM , whereas the EtOH concentration was up to 1%. The same percentage of EtOH was present in controls and was found not to alter *per se* the parameters evaluated.

Animals

Thirty-day-old (juvenile) Wistar rats obtained from our breeding colony were used. The animals were maintained under a 12 : 12 h light/dark cycle in an air-conditioned colony room at 22 ± 1 °C, with free access to water and 20% (w/w) protein commercial chow (Nuvilab CR-1, Quimtia, Colombo, Brazil). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal research of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, and followed the National Institutes of Health guide for

the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1996).

Preparation of mitochondrial fractions

Mitochondria from the heart were prepared according to Ferranti *et al.* [82] with some modifications [28], as well as from skeletal muscle in some experiments, as described previously [83]. The final pellet was resuspended in 10 mM Hepes buffer (pH 7.2) without EGTA containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose and 0.1% BSA (free fatty acid) (heart) or 10 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 225 mM mannitol and 75 mM sucrose (skeletal muscle) at an approximate protein concentration of 15 mg·mL⁻¹. The protein concentration was measured in accordance with the method of Lowry *et al.* [84] using BSA as standard. Mitochondria obtained from the heart and skeletal muscle were used in the assays immediately after isolation and were carried out in the absence or presence of Ca²⁺.

Preparation of permeabilized myocardial fibers

Cardiac muscle fibers were prepared as described previously [78], with some modifications [83]. Approximately 6 mg of permeabilized ventricle muscle (saponin) was utilized in the assays.

Cell cultures

A heart-derived (ventricular myoblasts, H9C2, number 0098) cell line was obtained from Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil). Cells were grown and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Culture medium was changed three times a week. Experiments were performed using cells between passages 10 and 14 at the time of the experiments, which were performed in cell cultures with 50–60% confluence [85]. Usually, new cultures were re-established from frozen stocks every 3 months.

Experimental procedures for the spectrofluorimetric assays

Measurements of $\Delta\Psi_m$, NAD(P)H content and Ca²⁺ retention capacity were performed using spectrofluorimetry in a medium containing 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mg·mL⁻¹ BSA, 2 mM KH₂PO₄, 30 μ M EGTA, 5 mM Hepes (pH 7.2) and 12 μ M Ca²⁺. Mitochondrial incubations were carried out at 37 °C, with continuous magnetic stirring. The assays were conducted in the presence of ATP synthase inhibitor oligomycin A (1 μ g·mL⁻¹) (resting respiration) using heart mitochondria (0.35 mg protein·mL⁻¹)

supported by 2.5 mM glutamate plus 2.5 mM malate. Myr and Cis-5 (10, 20 or 30 μ M), CaCl₂ (30 μ M) and CCCP (3 μ M) were added as indicated where appropriate. In some experiments, RR (1 μ M), CsA (1 μ M) plus ADP (300 μ M), CAT (1 μ M) or dithiothreitol (5 mM) were added to the incubation medium. Traces are representative of independent experiments carried out in mitochondrial preparations from the hearts of three animals and are expressed as fluorescence arbitrary units (FAU), unless otherwise stated. Statistical analyses were also carried out by quantitatively analyzing the fluorescence changes observed between 150 and 250 s after the beginning of the assays.

$\Delta\Psi_m$

$\Delta\Psi_m$ was estimated as described previously [86,87]. The fluorescence of 5 μ M cationic dye safranin O, a $\Delta\Psi_m$ indicator, was followed at excitation and emission wavelengths of 495 and 586 nm. CCCP was added at the end of measurements to abolish $\Delta\Psi_m$. Higher safranin O fluorescence levels reflect lower $\Delta\Psi_m$ values.

Mitochondrial NAD(P)H

Mitochondrial matrix NAD(P)H fluorescence was measured at 340 nm excitation and 450 nm emission wavelengths and CCCP was added at the end of the measurements to induce maximal NAD(P)H oxidation.

Mitochondrial Ca²⁺ retention capacity

Ca²⁺ retention capacity was determined following the external free Ca²⁺ levels using 0.2 μ M Calcium Green-5N (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at excitation and emission wavelengths of 506 and 532 nm, respectively [50]. A low concentration of ADP (10 μ M) was present in the incubation medium containing heart or skeletal muscle mitochondrial preparations to achieve more consistent mitochondrial Ca²⁺ uptake responses [50]. Single (30 μ M) or successive (5 μ M) additions of CaCl₂ were used in the experiments. At the end of the measurements, maximal Ca²⁺ release was induced by CCCP.

Respiratory parameters determined via mitochondrial oxygen consumption

The rate of oxygen consumption was measured using an Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) in a thermostatically controlled (37 °C) and magnetically stirred incubation chamber [88] with modifications [83]. The assay was performed with mitochondrial preparations (0.1 (mg protein)⁻¹·mL⁻¹ using 2.5 mM glutamate plus 2.5 mM malate or 5 mM succinate plus 1 μ M of the CI inhibitor rotenone as substrates) and incubated in a buffer

containing 0.3 M sucrose, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 0.1 mg·mL⁻¹ BSA, 5 mM Mops (pH 7.4). Myr and Cis-5 (10, 20 or 30 μM) was added to the reaction medium at the beginning of the assay. State 3 respiration was measured after the addition of 1 mM ADP to the incubation medium and uncoupled respiration after the addition of 1 μM CCCP. To measure resting (state 4) respiration, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oligomycin A was added to the incubation medium. The RCR (state 3/state 4) was then calculated. States 3, 4 and uncoupled are expressed as pmol O_2 consumed·s⁻¹·(mg protein)⁻¹. Only mitochondrial preparations with RCR > 3 were used in the experiments. In some experiments, GDP (200 μM), CAT (1 μM), DPC (100 μM), alamethicin (40 $\mu\text{g}\cdot(\text{mg protein})^{-1}$) or Mal (0.2 mM) was added to the mitochondrial preparations.

We also measured oxygen consumption in mitochondrial preparations and permeabilized myocardial fibers in the same medium above at 37 °C, using a SUIIT protocol. Pyruvate (5 mM), malate (0.5 mM for mitochondria or 5 mM for fibers) and glutamate (10 mM) (PMG) or succinate (10 mM) were used as substrates to determine CI- or CII-linked respiration, respectively. ADP was added at a final concentration of 400 μM to achieve full OXPHOS capacity. Oligomycin (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added to reconstitute convergent CI&II-linked leak respiration. Titration with the uncoupler CCCP (0.5–1 μM) was performed to determine electron transfer system capacity [78,89].

The rate of oxygen consumption was also measured in cardiomyocytes. Prior to the assay, the cells were centrifuged for 5 min at 500 g and resuspended in 20 mM Hepes buffer (pH 7.4) containing 0.11 M sucrose, 10 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM EGTA, 0.1 mg·mL⁻¹ BSA, 60 mM K-lactobionate, 20 mM tarurine and 3 mM MgCl_2 . The cells were permeabilized with digitonin (5 μM) and incubated with 10 mM glutamate plus 5 mM malate as substrates. Myr and Cis-5 (50 μM) were pre-incubated at 37 °C with the cells for 10 min followed by the addition of ADP (1 mM) to measure state 3 respiration during 5 min. Resting respiration (state 4) was determined after the addition of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ oligomycin. Finally, CCCP (1.5 μM) was added as a supplement to the medium and uncoupled respiration was measured.

GDH, SDH and MDH activities

The activities of GDH, SDH and MDH were measured in a SpectraMax M5 microplate spectrofluorimeter (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) in the presence of protein heart mitochondria (GDH, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; SDH 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; MDH, 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) pre-incubated in the presence of Myr or Cis-5 (10 or 30 μM) for 30 min at 37 °C in the technique buffer before the assays. Subsequently, GDH activity was determined as described by Melo *et al.* [90], with SDH activity being determined by the method of Fischer *et al.* [91] and MDH activity as described by Kitto [92]. GDH and SDH

activities are expressed as nmol·min⁻¹·(mg protein)⁻¹ and MDH as $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg protein})^{-1}$.

CI and II activities of the respiratory chain

The activities of respiratory chain CI (NADH:ubiquinone oxidoreductase) and II [succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase] were measured in a SpectraMax M5 microplate spectrofluorimeter in the presence of 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (CI) and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (CII) of protein (heart mitochondria) pre-incubated in the presence of Myr or Cis-5 (10 or 30 μM) for 30 min at 30 °C in the technique buffer before the assays. CI activity was assayed as described by Brunmair *et al.* [93] and CII activity was determined according to Fischer *et al.* [91]. The activities of the respiratory chain complexes were calculated as nmol·min⁻¹·(mg protein)⁻¹.

ATP production

ATP was determined using the firefly luciferin–luciferase assay system in accordance with the manufacturer's instructions [94,95] with modifications [96]. Heart mitochondrial fractions (0.1 mg protein·mL⁻¹) were incubated in respiring medium containing 0.3 M sucrose, 5 mM Mops, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA and 0.1 mg·mL⁻¹ BSA (pH 7.4), using 2.5 mM malate plus 2.5 mM glutamate as substrates in a final volume of 500 μL . The reaction was started by the addition of 1 mM ADP. Myr and Cis-5 (5, 10 or 30 μM) was added to the reaction medium at the beginning of the assay. The luminescence was measured in a SpectraMax I3 microplate spectrofluorimeter. In some experiments, oligomycin A was used as a positive control.

Mitochondrial membrane fluidity

Membrane fluidity was evaluated in mitochondrial membranes by fluorescence anisotropy (*r*). Briefly, mitochondrial preparations (0.1 mg of protein) were resuspended in 1 mL of 10 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4) and 200 μL of diphenylhexatriene in tetrahydrofuran solution (0.2 mM) was added and incubated at 37 °C for 30 min in the presence of 30 μM . Myr or Cis-5 was added to the reaction medium at the beginning of the assay. Fluorescence was then determined at 365 nm (excitation) and 430 nm (emission) in a SpectraMax M5 microplate spectrofluorimeter equipped with a polarizer system. Fluorescence anisotropy data were calculated as described previously [97,98].

MDA and GSH levels

Determination of MDA and GSH levels was carried out in supernatants from hearts pre-incubated with Myr or Cis-5 (100 μM) for 1 h at 37 °C. The rats were initially

intracardiacally perfused with saline solution during 5 min after being anesthetized with a mixture of ketamine (75 mg·kg⁻¹) and xilazine (10 mg·kg⁻¹). After perfusion, the heart was rapidly removed and supernatants were obtained as described previously [99].

MDA concentrations were measured in heart supernatants in terms of thiobarbituric acid reactive substances [100] with slight modifications [101]. GSH concentrations were measured as described by Browne and Armstrong [102]. The results are expressed as nmol·(mg protein)⁻¹.

Statistical analysis

The results are presented as the mean ± SD, with the median being used for statistical analysis. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the post-hoc Duncan's multiple range test when multiple comparisons were performed, whereas Student's *t*-test was used for paired samples when a single parameter was compared between two different groups. *P* < 0.05 was considered statistically significant for differences between groups. Only significant *F* values are shown in the text. All analyses were carried out using SPSS, version 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, # 404883/2013-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, # 2266-2551/14-2), Pró-Reitoria de Pesquisa/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS, # PIBITI 18489) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN, # 573677/2008-5).

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author contributions

CC planned and performed the experiments and analyzed the data. AUA planned the experiments, analyzed the data and wrote the paper. JCS, AW and AZ performed the experiments. SMW prepared the cell cultures. MOVS and LHRS provided technical support and prepared the samples. RFC analyzed data and corrected the paper. MW provided financial support, planned the experiments, analyzed the data and wrote the paper.

References

- 1 Arnold GL, Van Hove J, Freedenberg D, Strauss A, Longo N, Burton B, Garganta C, Ficicioglu C, Cederbaum S, Harding C *et al.* (2009) A Delphi clinical practice protocol for the management of very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* **96**, 85–90.
- 2 Spiekerkoetter U, Lindner M, Santer R, Grotzke M, Baumgartner MR, Boehles H, Das A, Haase C, Hennermann JB, Karall D *et al.* (2009) Treatment recommendations in long-chain fatty acid oxidation defects: consensus from a workshop. *J Inher Metab Dis* **32**, 498–505.
- 3 Saudubray JM, Martin D, de Lonlay P, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, Jouvet P, Boutron M, Slama A, Vianey-Saban C *et al.* (1999) Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J Inher Metab Dis* **22**, 488–502.
- 4 Scott Schwoerer J, Cooper G & van Calcar S (2015) Rhabdomyolysis in a neonate due to very long chain acyl CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab Rep* **3**, 39–41.
- 5 Roe CR & Ding J (2005) Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Disorders. McGraw-Hill, Columbus, OH.
- 6 Bennett MJ, Rinaldo P & Strauss AW (2000) Inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *Crit Rev Clin Lab Sci* **37**, 1–44.
- 7 Spiekerkoetter U, Sun B, Zytkevicz T, Wanders R, Strauss AW & Wendel U (2003) MS/MS-based newborn and family screening detects asymptomatic patients with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Pediatr* **143**, 335–342.
- 8 Spiekerkoetter U (2010) Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening. *J Inher Metab Dis* **33**, 527–532.
- 9 Diekman EF, Ferdinandusse S, van der Pol L, Waterham HR, Ruiten JP, Ijlst L, Wanders RJ, Houten SM, Wijburg FA, Blank AC *et al.* (2015) Fatty acid oxidation flux predicts the clinical severity of VLCAD deficiency. *Genet Med* **17**, 989–994.
- 10 Katz S, Landau Y, Pode-Shakked B, Pessach IM, Rubinshtein M, Anikster Y, Salem Y & Paret G (2017) Cardiac failure in very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency requiring extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) treatment: a case report and review of the literature. *Mol Genet Metab Rep* **10**, 5–7.
- 11 Vianey-Saban C, Divry P, Brivet M, Nada M, Zabot MT, Mathieu M & Roe C (1998) Mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. *Clin Chim Acta* **269**, 43–62.

- 12 Andresen BS, Olpin S, Kvittingen EA, Augoustides-Savvopoulou P, Lindhout D, Halley DJ, Vianey-Saban C, Wanders RJ, IJlst L, Schroeder LD *et al.* (1999) DNA-based prenatal diagnosis for very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis* **22**, 281–285.
- 13 Baruteau J, Sachs P, Broue P, Brivet M, Abdoul H, Vianey-Saban C & Ogier de Baulny H (2014) Clinical and biological features at diagnosis in mitochondrial fatty acid beta-oxidation defects: a French pediatric study from 187 patients. Complementary data. *J Inherit Metab Dis* **37**, 137–139.
- 14 Laforet P, Acquaviva-Bourdain C, Rigal O, Brivet M, Penisson-Besnier I, Chabrol B, Chaigne D, Boespflug-Tanguy O, Laroche C, Bedat-Millet AL *et al.* (2009) Diagnostic assessment and long-term follow-up of 13 patients with Very Long-Chain Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (VLCAD) deficiency. *Neuromusc Dis* **19**, 324–329.
- 15 Wilcken B (2007) Newborn screening for cystic fibrosis: techniques and strategies. *J Inherit Metab Dis* **30**, 537–543.
- 16 Spiekerkoetter U & Wood PA (2010) Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: pathophysiological studies in mouse models. *J Inherit Metab Dis* **33**, 539–546.
- 17 Roe CR & Brunengraber H (2015) Anaplerotic treatment of long-chain fat oxidation disorders with triheptanoin: review of 15 years Experience. *Mol Genet Metab* **116**, 260–268.
- 18 Vockley J, Charrow J, Ganesh J, Eswara M, Diaz GA, McCracken E, Conway R, Enns GM, Starr J, Wang R *et al.* (2016) Triheptanoin treatment in patients with pediatric cardiomyopathy associated with long chain-fatty acid oxidation disorders. *Mol Genet Metab* **119**, 223–231.
- 19 Aires V, Delmas D, Le Bachelier C, Latruffe N, Schlemmer D, Benoist JF, Djouadi F & Bastin J (2014) Stilbenes and resveratrol metabolites improve mitochondrial fatty acid oxidation defects in human fibroblasts. *Orphan J Rare Dis* **9**, 79.
- 20 Gobin-Limballe S, Djouadi F, Aubey F, Olpin S, Andresen BS, Yamaguchi S, Mandel H, Fukao T, Ruitter JP, Wanders RJ *et al.* (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.
- 21 Olpin SE (2013) Pathophysiology of fatty acid oxidation disorders and resultant phenotypic variability. *J Inherit Metab Dis* **36**, 645–658.
- 22 Tucci S, Pearson S, Herebian D & Spiekerkoetter U (2013) Long-term dietary effects on substrate selection and muscle fiber type in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD(-/-)) mice. *Biochem Biophys Acta* **1832**, 509–516.
- 23 Diekman EF, van der Pol WL, Nivelstein RA, Houten SM, Wijburg FA & Visser G (2014) Muscle MRI in patients with long-chain fatty acid oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis* **37**, 405–413.
- 24 Ventura FV, Ruitter JP, IJlst L, deAlmeida IT & Wanders RJ (1998) Lactic acidosis in long-chain fatty acid beta-oxidation disorders. *J Inherit Metab Dis* **21**, 645–654.
- 25 Tucci S, Fogel U, Hermann S, Sturm M, Schafers M & Spiekerkoetter U (2014) Development and pathomechanisms of cardiomyopathy in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD(-/-)) mice. *Biochem Biophys Acta* **1842**, 677–685.
- 26 Xiong D, He H, James J, Tokunaga C, Powers C, Huang Y, Osinska H, Towbin JA, Purevjav E, Balschi JA *et al.* (2014) Cardiac-specific VLCAD deficiency induces dilated cardiomyopathy and cold intolerance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **306**, H326–H338.
- 27 Tonin AM, Ferreira GC, Grings M, Viegas CM, Busanello EN, Amaral AU, Zanatta A, Schuck PF & Wajner M (2010) Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain. *Life Sci* **86**, 825–831.
- 28 Cecatto C, Hickmann FH, Rodrigues MD, Amaral AU & Wajner M (2015) Deregulation of mitochondrial functions provoked by long-chain fatty acid accumulating in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and mitochondrial permeability transition deficiencies in rat heart–mitochondrial permeability transition pore opening as a potential contributing pathomechanism of cardiac alterations in these disorders. *FEBS J* **282**, 4714–4726.
- 29 Hickmann FH, Cecatto C, Kleemann D, Monteiro WO, Castilho RF, Amaral AU & Wajner M (2015) Uncoupling, metabolic inhibition and induction of mitochondrial permeability transition in rat liver mitochondria caused by the major long-chain hydroxyl monocarboxylic fatty acids accumulating in LCHAD deficiency. *Biochem Biophys Acta* **1847**, 620–628.
- 30 Costa CG, Dorland L, Holwerda U, de Almeida IT, Poll-The BT, Jakobs C & Duran M (1998) Simultaneous analysis of plasma free fatty acids and their 3-hydroxy analogs in fatty acid beta-oxidation disorders. *Clin Chem* **44**, 463–471.
- 31 Mc OR, Norgaard MG, Sacchetti M, van Engelen BG & Vissing J (2004) Fuel utilization in patients with very long-chain acyl-coa dehydrogenase deficiency. *Ann Neurol* **56**, 279–283.
- 32 Mathur A, Sims HF, Gopalakrishnan D, Gibson B, Rinaldo P, Vockley J, Hug G & Strauss AW (1999) Molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-CoA

- dehydrogenase deficiency causing pediatric cardiomyopathy and sudden death. *Circulation* **99**, 1337–1343.
- 33 Wanders RJ, Vreken P, den Boer ME, Wijburg FA, van Gennip AH & IJlst L (1999) Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis* **22**, 442–487.
- 34 den Boer ME, Wanders RJ, Morris AA, IJlst L, Heymans HS & Wijburg FA (2002) Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. *Pediatrics* **109**, 99–104.
- 35 Tyni T, Rapola J, Paetau A, Palotie A & Pihko H (1997) Pathology of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency caused by the G1528C mutation. *Pediatr Pathol Lab Med* **17**, 427–447.
- 36 Sewell AC, Bender SW, Wirth S, Munterfering H, IJlst L & Wanders RJ (1994) Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: a severe fatty acid oxidation disorder. *Eur J Pediatr* **153**, 745–750.
- 37 Ventura FV, Ruiter JP, IJlst L, de Almeida IT & Wanders RJ (1996) Inhibitory effect of 3-hydroxyacyl-CoAs and other long-chain fatty acid beta-oxidation intermediates on mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Inherit Metab Dis* **19**, 161–164.
- 38 Hoffmann L, Seibt A, Herebian D & Spiekerkoetter U (2014) Monounsaturated 14:1n-9 and 16:1n-9 fatty acids but not 18:1n-9 induce apoptosis and necrosis in murine HL-1 cardiomyocytes. *Lipids* **49**, 25–37.
- 39 Waisbren SE, Landau Y, Wilson J & Vockley J (2013) Neuropsychological outcomes in fatty acid oxidation disorders: 85 cases detected by newborn screening. *Dev Disabil Res Rev* **17**, 260–268.
- 40 Engbers HM, Dorland L, de Sain MG, Eskes PF & Visser G (2005) Rhabdomyolysis in early-onset very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency despite normal glucose after fasting. *J Inherit Metab Dis* **28**, 1151–1152.
- 41 Exil VJ, Gardner CD, Rottman JN, Sims H, Bartelds B, Khuchua Z, Sindhal R, Ni G & Strauss AW (2006) Abnormal mitochondrial bioenergetics and heart rate dysfunction in mice lacking very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H1289–H1297.
- 42 Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL *et al.* (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 341–345.
- 43 De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I & Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**, 336–340.
- 44 Marchi S & Pinton P (2014) The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *J Physiol* **592**, 829–839.
- 45 Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, Fergusson MM, Rovira II, Allen M, Springer DA *et al.* (2013) The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol* **15**, 1464–1472.
- 46 Pendin D, Greotti E & Pozzan T (2014) The elusive importance of being a mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Calcium* **55**, 139–145.
- 47 Drago I, De Stefani D, Rizzuto R & Pozzan T (2012) Mitochondrial Ca²⁺ uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca²⁺ peaks in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 12986–12991.
- 48 Moore CL (1971) Specific inhibition of mitochondrial Ca⁺⁺ transport by ruthenium red. *Biochem Biophys Res Comm* **42**, 298–305.
- 49 Rottenberg H & Marbach M (1989) Adenine nucleotides regulate Ca²⁺ transport in brain mitochondria. *FEBS Lett* **247**, 483–486.
- 50 Saito A & Castilho RF (2010) Inhibitory effects of adenine nucleotides on brain mitochondrial permeability transition. *Neurochem Res* **35**, 1667–1674.
- 51 Yarana C, Sripetchwandee J, Sanit J, Chattipakorn S & Chattipakorn N (2012) Calcium-induced cardiac mitochondrial dysfunction is predominantly mediated by cyclosporine A-dependent mitochondrial permeability transition pore. *Arch Med Res* **43**, 333–338.
- 52 Pottecher J, Guillot M, Belaidi E, Charles AL, Lejay A, Gharib A, Diemunsch P & Geny B (2013) Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* **57** (1100–1108), e2.
- 53 Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA & Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* **280**, 18558–18561.
- 54 Tanveer A, Virji S, Andreeva L, Totty NF, Hsuan JJ, Ward JM & Crompton M (1996) Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Europ J Biochem* **238**, 166–172.
- 55 Ricchelli F, Gobbo S, Moreno G & Salet C (1999) Changes of the fluidity of mitochondrial membranes induced by the permeability transition. *Biochemistry* **38**, 9295–9300.
- 56 Colell A, Garcia-Ruiz C, Lluís JM, Coll O, Mari M & Fernandez-Checa JC (2003) Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J Biol Chem* **278**, 33928–33935.
- 57 Bodrova ME, Brailovskaya IV, Efron GI, Starkov AA & Mokhova EN (2003) Cyclosporin A-sensitive

- decrease in the transmembrane potential across the inner membrane of liver mitochondria induced by low concentrations of fatty acids and Ca²⁺. *Biochem Biokhimiia* **68**, 391–398.
- 58 Penzo D, Tagliapietra C, Colonna R, Petronilli V & Bernardi P (2002) Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death. *Biochem Biophys Acta* **1555**, 160–165.
- 59 Zoratti M & Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Acta* **1241**, 139–176.
- 60 Starkov AA (2010) The molecular identity of the mitochondrial Ca²⁺ sequestration system. *FEBS J* **277**, 3652–3663.
- 61 Rasola A & Bernardi P (2011) Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* **50**, 222–233.
- 62 Wojtczak L, Wieckowski MR & Schonfeld P (1998) Protonophoric activity of fatty acid analogs and derivatives in the inner mitochondrial membrane: a further argument for the fatty acid cycling model. *Arch Biochem Biophys* **357**, 76–84.
- 63 Schonfeld P, Jezek P, Belyaeva EA, Borecky J, Slyshenkov VS, Wieckowski MR & Wojtczak L (1996) Photomodification of mitochondrial proteins by azido fatty acids and its effect on mitochondrial energetics. Further evidence for the role of the ADP/ATP carrier in fatty-acid-mediated uncoupling. *Europ J Biochem* **240**, 387–393.
- 64 Schonfeld P & Bohnensack R (1997) Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. *FEBS Lett* **420**, 167–170.
- 65 Wieckowski MR & Wojtczak L (1998) Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett* **423**, 339–342.
- 66 Di Paola M, Zaccagnino P, Oliveros-Celis C & Lorusso M (2006) Arachidonic acid induces specific membrane permeability increase in heart mitochondria. *FEBS Lett* **580**, 775–781.
- 67 Affouret C, Crichton PG, Parker N & Brand MD (2007) Novel uncoupling proteins. *Novartis Found Symp* **287**, 70–80; discussion 80–91.
- 68 Skulachev VP (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochem Biophys Acta* **1363**, 100–124.
- 69 Mokhova EN & Khailova LS (2005) Involvement of mitochondrial inner membrane anion carriers in the uncoupling effect of fatty acids. *Biochem Biokhimiia* **70**, 159–163.
- 70 Schonfeld P, Schild L & Kunz W (1989) Long-chain fatty acids act as protonophoric uncouplers of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Acta* **977**, 266–272.
- 71 Schonfeld P (1992) Anion permeation limits the uncoupling activity of fatty acids in mitochondria. *FEBS Lett* **303**, 190–192.
- 72 Goglia F & Skulachev VP (2003) A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J* **17**, 1585–1591.
- 73 Samartsev VN, Marchik EI & Shamagulova LV (2011) Free fatty acids as inducers and regulators of uncoupling of oxidative phosphorylation in liver mitochondria with participation of ADP/ATP- and aspartate/glutamate-antiporter. *Biochem Biokhimiia* **76**, 217–224.
- 74 Bodrova ME, Dedukhova VI, Samartsev VN & Mokhova EN (2000) Role of the ADP/ATP-antiporter in fatty acid-induced uncoupling of Ca²⁺-loaded rat liver mitochondria. *IUBMB Life* **50**, 189–194.
- 75 Schonfeld P, Wieckowski MR & Wojtczak L (2000) Long-chain fatty acid-promoted swelling of mitochondria: further evidence for the protonophoric effect of fatty acids in the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett* **471**, 108–112.
- 76 Zackova M, Kramer R & Jezek P (2000) Interaction of mitochondrial phosphate carrier with fatty acids and hydrophobic phosphate analogs. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 499–508.
- 77 Wieckowski MR & Wojtczak L (1997) Involvement of the dicarboxylate carrier in the protonophoric action of long-chain fatty acids in mitochondria. *Biochem Biophys Res Comm* **232**, 414–417.
- 78 Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R & Kunz WS (2008) Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* **3**, 965–976.
- 79 Ronchi JA, Francisco A, Passos LA, Figueira TR & Castilho RF (2016) The contribution of nicotinamide nucleotide transhydrogenase to peroxide detoxification is dependent on the respiratory state and counterbalanced by other sources of NADPH in liver mitochondria. *J Biol Chem* **291**, 20173–20187.
- 80 Nickl AG, von Hardenberg A, Hohl M, Löffler JR, Kohlhaas M, Becker J, Reil JC, Kazakov A, Bonnekoh J, Stadelmaier M *et al.* (2015) Reversal of mitochondrial transhydrogenase causes oxidative stress in heart failure. *Cell Metab* **22**, 472–484.
- 81 Oey NA, den Boer ME, Wijburg FA, Vekemans M, Auge J, Steiner C, Wanders RJ, Waterham HR, Ruitter JP & Attie-Bitach T (2005) Long-chain fatty acid oxidation during early human development. *Pediatr Res* **57**, 755–759.
- 82 Ferranti R, da Silva MM & Kowaltowski AJ (2003) Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening decreases reactive oxygen species generation. *FEBS Lett* **536**, 51–55.

- 83 Cecatto C, Godoy Kdos S, da Silva JC, Amaral AU & Wajner M (2016) Disturbance of mitochondrial functions provoked by the major long-chain 3-hydroxylated fatty acids accumulating in MTP and LCHAD deficiencies in skeletal muscle. *Toxicol In Vitro* **36**, 1–9.
- 84 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.
- 85 Kuznetsov AV, Javadov S, Sickinger S, Frotschnig S & Grimm M (2015) H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochem Biophys Acta* **1853**, 276–284.
- 86 Akerman KE & Wikstrom MK (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* **68**, 191–197.
- 87 Figueira TR, Melo DR, Vercesi AE & Castilho RF (2012) Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods Mol Biol* **810**, 103–117.
- 88 Gnaiger E (2009) Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1837–1845.
- 89 Makrecka-Kuka M, Krumschnabel G & Gnaiger E (2015) High-resolution respirometry for simultaneous measurement of oxygen and hydrogen peroxide fluxes in permeabilized cells, tissue homogenate and isolated mitochondria. *Biomolecules* **5**, 1319–1338.
- 90 Melo DR, Miranda SR, Assuncao NA & Castilho RF (2012) Methylmalonate impairs mitochondrial respiration supported by NADH-linked substrates: involvement of mitochondrial glutamate metabolism. *J Neurosci Res* **90**, 1190–1199.
- 91 Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JMF, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RCA & Janssen AJM (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* **153**, 23–36.
- 92 Kitto GB (1969) Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenase from chicken and tuna heart. *Methods Enzymol* **13**, 106–116.
- 93 Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhausl W *et al.* (2004) Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* **53**, 1052–1059.
- 94 Lemasters JJ & Hackenbrock CR (1976) Continuous measurement and rapid kinetics of ATP synthesis in rat liver mitochondria, mitoplasts and inner membrane vesicles determined by firefly-luciferase luminescence. *Europ J Biochem* **67**, 1–10.
- 95 Maioli MA, Lemos DE, Guelfi M, Medeiros HC, Riet-Correa F, Medeiros RM, Barbosa-Filho JM & Mingatto FE (2012) Mechanism of the uncoupling of oxidative phosphorylation by juliprosopine on rat brain mitochondria. *Toxicol* **60**, 1355–1362.
- 96 Cecatto C, Hickmann FH, Rodrigues MDN, Amaral AU & Wajner M (2015) Deregulation of mitochondrial functions provoked by LCHFA accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat heart: mPT pore opening as a potential contributing pathomechanism of cardiac alterations in these disorders. *FEBS J* **282**, 4714–4726.
- 97 Martins NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML & Santos AC (2008) Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol* **28**, 337–344.
- 98 Praet M, Laghmiche M, Pollakis G, Goormaghtigh E & Ruyschaert JM (1986) In vivo and in vitro modifications of the mitochondrial membrane induced by 4' Epi-adriamycin. *Biochem Pharmacol* **35**, 2923–2928.
- 99 Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S & Lissi EA (2001) Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* **388**, 261–266.
- 100 Esterbauer H & Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* **186**, 407–421.
- 101 da Silva JC, Amaral AU, Cecatto C, Wajner A, Dos Santos Godoy K, Ribeiro RT, de Mello Goncalves A, Zanatta A, da Rosa MS, Loureiro SO *et al.* (2017) alpha-Ketoadipic acid and alpha-Amino adipic acid cause disturbance of glutamatergic neurotransmission and induction of oxidative stress in vitro in brain of adolescent rats. *Neurotox Res* **32**, 276–290.
- 102 Browne RW & Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* **108**, 347–352.

CAPÍTULO II

Disturbance of mitochondrial functions associated with permeability transition pore opening induced by cis-5-tetradecenoic and myristic acids in liver of adolescent rats

Cristiane Cecatto, Alexandre Umpierrez Amaral, Alessandro Wajner, Simone Magagnin Wajner, Roger Frigério Castilho, Moacir Wajner

Artigo científico submetido para
Mitochondrion

CAPÍTULO III

Deregulation of mitochondrial bioenergetics and permeability transition induction caused by major long-chain fatty acids accumulating in VLCAD deficiency in skeletal muscle as potential pathomechanisms of myopathy

Cristiane Cecatto, Alexandre Umpierrez Amaral, Ana Cristina Roginski, Roger Frigério Castilho, Moacir Wajner

Artigo científico submetido para
Toxicology in Vitro

PARTE III: Discussão e Conclusões

3. DISCUSSÃO

As deficiências hereditárias da oxidação de ácidos graxos são doenças associadas com alta morbidade e mortalidade, e por isso tem atraído muito interesse nos últimos anos, sendo algumas delas incluídas na triagem neonatal em massa em muitos países. O diagnóstico dessas doenças no recém-nascido demonstrou que a incidência dessas doenças é mais alta do que originalmente estabelecido em triagens seletivas (pacientes sintomáticos). A implementação da triagem neonatal permite que logo após o diagnóstico pré-sintomático os pacientes recebam tratamento imediatamente após o nascimento, impedindo ou diminuindo os efeitos deletérios agudos e crônicos encontrados em pacientes afetados por essas doenças (MERRITT; NORRIS; KANUNGO, 2018; WILCKEN et al., 2003). No entanto, o tratamento desses distúrbios metabólicos por restrição dietética e suplementação com MCT como é feito atualmente não consegue prevenir por completo a morbidade e também a mortalidade, se fazendo, portanto, necessário esclarecer os complexos mecanismos patogênicos na VLCADD.

A obtenção de energia a partir de ácidos graxos de cadeia longa (LCFA) está muito prejudicada na VLCADD. Assim, a sintomatologia piora durante episódios catabólicos da doença como o jejum ou os processos infecciosos, afetando os tecidos que mais utilizam LCFA como fonte de energia primária, tais como o coração, fígado e músculo esquelético (MC et al., 2004). Pacientes com VLCADD geralmente apresentam manifestações cardíacas severas, nas quais a privação de energia parece desempenhar um papel importante (MATHUR et al., 1999). Entretanto, os mecanismos precisos envolvendo as manifestações clínicas estão ainda pouco estabelecidos. Como dito anteriormente, durante as crises agudas de descompensação metabólica, os sintomas e sinais clínicos se acentuam,

principalmente com arritmia cardíaca e insuficiência hepática, que coincidem com um aumento acentuado nos tecidos e nos líquidos biológicos das concentrações dos ácidos graxos e de seus derivados de carnitina, tornando concebível que esses compostos acumulados possam contribuir para a patogênese dessa doença.

A mortalidade e a morbidade na maioria das crianças com VLCADD são diminuídas pelo diagnóstico pela triagem neonatal expandida e o tratamento precoce, com restrição de ácidos graxos de cadeia longa (LCFA), sugerindo que esses compostos possam contribuir para o dano tecidual e os sintomas apresentados pelos pacientes (SPIEKERKOETTER, 2010; SPIEKERKOETTER; LINDNER; SANTER; GROTZKE; BAUMGARTNER; BOEHLES; DAS; HAASE; HENNERMANN; KARALL; KLERK; et al., 2009; SPIEKERKOETTER et al., 2003; WANDERS et al., 1999). Além disso, os episódios com manifestações cardíacas severas não podem ser completamente prevenidos, indicando que a terapia atual não é bem sucedida, e enfatizando a necessidade de se investigar os mecanismos de patogênese dessa doença para o desenvolvimento de outras estratégias terapêuticas (WAISBREN et al., 2013).

As alterações morfológicas mitocondriais, rabdomiólise e acidemia láctica que foram reportadas em alguns pacientes afetados (DIEKMAN et al., 2014; ENGBERS et al., 2005; SAUDUBRAY et al., 1999; VENTURA et al., 1998), bem como esteatose hepática, proliferação mitocondrial no coração (LAFORET et al., 2009; PRIMASSIN et al., 2010; TUCCI et al., 2010), e dano na bioenergética mitocondrial em tecidos obtidos a partir de um modelo genético animal com VLCADD (EXIL et al., 2006; TUCCI et al., 2014) indicam que um comprometimento da homeostase energética mitocondrial pode estar envolvido na patogênese dessa doença. Neste particular, estudos prévios demonstraram que os derivados de acil-

CoA de cadeia longa inibem a síntese de ATP e o consumo de oxigênio (estado 3) em mitocôndrias de fígado (VENTURA et al., 2005). Além disso, o Myr demonstrou ser capaz de desacoplar a OXPHOS com envolvimento do carreador de dicarboxilatos (WIECKOWSKI; WOJTCZAK, 1997) e do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) (BODROVA et al., 2000), bem como induzir a abertura do PTP sensível à ciclosporina A (CsA), inibidora da CyP D, em mitocôndrias de fígado carregadas com Ca^{2+} (BODROVA et al., 2003; WIĘCKOWSKI; WOJTCZAK, 1998).

No entanto, não há na literatura estudos sobre os efeitos do Myr em outros tecidos e especialmente do Cis-5, que é o marcador bioquímico para o diagnóstico da VLCADD (ROE, CHARLES R; DING, 2005), sobre funções mitocondriais críticas e a suscetibilidade dos diversos tecidos afetados. Portanto, nesse trabalho estudamos os efeitos do Cis-5 e Myr sobre uma ampla gama de importantes parâmetros bioenergéticos em preparações mitocondriais de coração, fígado e músculo esquelético, bem como em células cultivadas e fibras musculares, na esperança de esclarecer os mecanismos pelos quais esses ácidos graxos prejudicam a homeostase celular.

De uma forma geral, demonstramos que o Cis-5 e o Myr, em concentrações patológicas (10 – 60 μ M) (COSTA et al., 1998), mas não fisiológicas (1 – 5 μ M), comprometem a bioenergética mitocondrial, atuando como desacopladores, inibidores metabólicos e indutores da abertura do PTP, causando a diminuição da produção de ATP, além de diminuir a capacidade de retenção de Ca^{2+} em mitocôndrias isoladas de coração, fígado e músculo esquelético, bem como em fibras musculares cardíacas e esqueléticas de ratos e em células hepáticas e cardíacas cultivadas.

Inicialmente, verificamos que o Cis-5 e o Myr, em concentrações similares às observadas no plasma de pacientes, aumentaram o consumo de oxigênio no estado de repouso (estado 4, após adição de oligomicina) da respiração mitocondrial e diminuíram o RCR em preparações mitocondriais obtidas de fígado, músculo cardíaco e esquelético, com todos substratos testados, indicando um comportamento desacoplador. Por outro lado, ambos ácidos graxos diminuíram marcadamente e de forma dose-dependente o consumo de oxigênio no estado 3 (estimulado por ADP) e desacoplado (após adição de CCCP) da respiração mitocondrial, utilizando glutamato mais malato como substrato, principalmente em mitocôndrias de músculo cardíaco e esquelético, com menor efeito em fígado, corroborando com a hipótese de que esses metabólitos também agem como potentes inibidores metabólicos em mitocôndrias. Também utilizamos somente glutamato ou piruvato mais malato como substratos e os efeitos provocados pelos Cis-5 e Myr foram semelhantes.

No entanto, quando utilizamos succinato como substrato os efeitos no consumo de oxigênio foram menos pronunciados do que aqueles observados utilizando-se glutamato mais malato em todos os tecidos testados, sugerindo que a possibilidade de que esses ácidos graxos prejudicam o transporte ou a oxidação de glutamato ou piruvato. Esta pode ocorrer pela inibição da atividade do complexo I, ou pela redução da atividade da AST que é necessária para a oxidação do glutamato, ou ainda devido a um bloqueio enzimático do ciclo do ácido cítrico. De fato, observamos inibição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias de coração e do complexo I-III em mitocôndrias de fígado e músculo esquelético, sem alterações nos complexos II ou IV. Nesse contexto, já foi observado inibição da atividade do complexo I da cadeia respiratória, principalmente,

mas também do II e III, associadas ao acúmulo dos ácidos graxos em alguns pacientes com deficiência da LCHAD (TYNI et al., 1996). Cis-5 e Myr também inibiram seletivamente a atividade da α -KGDH do ciclo do ácido cítrico em mitocôndrias de fígado, sem alterar as atividades da GDH, SDH, MDH, IDH, CS deste ciclo, bem como a AST.

Por outro lado, sabe-se que o transporte de glutamato para dentro da mitocôndria é dependente do potencial de membrana formado, uma vez que ao entrar uma molécula de glutamato também entra um próton, e por isso esse transporte pode ser prejudicado por desacoplamento (GNAIGER, 2014). No que se refere ao menor efeito observado sobre a respiração celular quando do uso de succinato como substrato, observamos que o transporte de succinato foi prejudicado pelo Myr em mitocôndrias de músculo esquelético e cardíaco, uma vez que a presença da alameticina, que forma poros na membrana mitocondrial e, portanto, permite o livre acesso do succinato ao interior da mitocôndria, atenuou os efeitos inibitórios causados no estado 3 da respiração, sugerindo uma competição entre o Myr e o succinato pelo carreador de dicarboxilatos. Resultados semelhantes foram previamente demonstrados em fígado de ratos (WIECKOWSKI; WOJTCZAK, 1997).

Como mencionado acima, o aumento da respiração de repouso (estado 4) causado pelo Cis-5 e Myr e a diminuição do RCR, aliados com a dissipação do $\Delta\Psi_m$ não dependente de Ca^{2+} são indicativos de efeito desacoplador da OXPHOS por parte desses ácidos. Efeitos similares tinham sido obtidos com o Myr em estudos prévios no fígado e no coração (SCHONFELD et al., 1996; WOJTCZAK; WIECKOWSKI; SCHONFELD, 1998). O ANT provavelmente está envolvido nesse efeito desacoplador, uma vez que o carboxiatractilosídeo (CAT), inibidor do ANT, atenuou o aumento do estado 4 em coração e fígado, bem como a dissipação do

$\Delta\Psi_m$ causados por Cis-5 e Myr em mitocôndrias de músculo esquelético e cardíaco. Resultados prévios demonstraram que o CAT preveniu a dissipação do $\Delta\Psi_m$ causada por Myr em mitocôndrias de fígado de ratos adultos, reforçando, portanto, a importância do ANT nesses efeitos (SCHONFELD; BOHNENSACK, 1997; WIECKOWSKI; WOJTCZAK, 1998). Em contraste, proteínas desacopladoras (UCP) e o antiporter glutamato/aspartato não estão envolvidos no desacoplamento, pois verificamos que seus respectivos inibidores, guanosina difosfato (GDP) e dietil pirocarbonato (DPC), não alteraram significativamente esse efeito (AFFOURTIT et al., 2007; MOKHOVA; KHAILOVA, 2005; SKULACHEV, VLADIMIR P., 1998). Acreditamos que o efeito desacoplador da OXPHOS pode ser resultado de um mecanismo protonofórico com um movimento transmembrana dos ácidos Cis-5 e Myr não-dissociados através da membrana mitocondrial interna, sendo facilitado pelo ANT (GOGLIA; SKULACHEV, 2003; SCHONFELD, 1992; SCHONFELD; SCHILD; KUNZ, 1989), o que vai ao encontro dos resultados prévios dos efeitos do Myr (BODROVA et al., 2000; SAMARTSEV; MARCHIK; SHAMAGULOVA, 2011). Considerando que a atividade do ANT e do estado 3 são fundamentais para a produção de ATP, sugere-se que a interação desses ácidos graxos com o ANT pode estar envolvida nos seus efeitos deletérios, comprometendo a bioenergética nos músculos cardíaco e esquelético, e no fígado. Por outro lado, já que o CAT atenuou, mas não preveniu completamente o desacoplamento do Cis-5 e Myr, não podemos excluir a possibilidade dos ânions de LCFA serem transferidos por outros carreadores mitocondriais, como os carreadores de mono e tricarbóxilatos (SCHONFELD; WIECKOWSKI; WOJTCZAK, 2000), bem como pelo carreador de fosfato (ZACKOVA; KRAMER; JEZEK, 2000).

Também demonstramos que os Cis-5 e Myr diminuíram a produção de ATP em mitocôndrias de fígado, coração e músculo esquelético, refletindo alterações bioenergéticas severas nesses tecidos, reforçando uma inibição metabólica importante causada por esses LCFA, provavelmente levando a célula a um déficit energético.

No presente trabalho também foi mostrado que o Cis-5 e o Myr dissiparam o $\Delta\Psi_m$ mitocondrial na ausência de Ca^{2+} em todos os tecidos testados, que também pode ser atribuído a um efeito desacoplador ou alternativamente a uma inibição metabólica ou aos dois mecanismos. Além disso, essa dissipação do $\Delta\Psi_m$ foi maior e de forma dose dependente na presença de Ca^{2+} , utilizando glutamato mais malato como substratos. Com o intuito de verificar se os efeitos observados no $\Delta\Psi_m$ foram atingidos apenas com o uso do glutamato mais malato como substratos, também testamos esse parâmetro utilizando outros substratos, como o succinato em mitocôndrias de fígado e piruvato mais malato no músculo esquelético. Uma vez mais verificamos que os efeitos causados pelos LCFA são de maior magnitude com o glutamato mais malato, quando comparado aos efeitos observados com succinato ou piruvato mais malato, indicando que é mais provável que os Cis-5 e Myr estejam prejudicando de forma mais marcada as vias de oxidação do glutamato.

Em todos os tecidos testados, a dissipação do $\Delta\Psi_m$ foi completamente prevenida por rutênio vermelho (RR), um inibidor do uniporte mitocondrial de Ca^{2+} (MOORE, 1971), bem como por CsA mais ADP (ROTTENBERG; MARBACH, 1989; SAITO; CASTILHO, 2010). Uma vez que a CsA inibe o PTP inativando a Cyp D, uma proteína da matriz associada com a formação do PTP (BASSO et al., 2005; POTTECHER et al., 2013; TANVEER et al., 1996; YARANA et al., 2012), enquanto que o ADP se liga ao ANT pelo lado da matriz mitocondrial inibindo o PTP

(ROTTENBERG; MARBACH, 1989; SAITO; CASTILHO, 2010), nossos resultados indicam que os Cis-5 e o Myr induzem a abertura do PTP.

A abertura do PTP pode ser provocada de diversas formas, tais como por estresse oxidativo, alterações na estrutura da membrana mitocondrial e dano ao DNA (NELSON; COX, 2017). Neste particular, é improvável que o dano às proteínas do poro tenha ocorrido por um ataque oxidativo por espécies reativas sobre tais proteínas, induzindo secundariamente a abertura do PTP causada por esses ácidos graxos, uma vez que eles não foram capazes de causar estresse oxidativo, medido pelos níveis de malondialdeído (MDA) e GSH, mesmo em altas concentrações (100 μ M) no coração. Além disso, os efeitos deletérios causados pelo Myr observados na respiração em mitocôndrias de músculo esquelético não foram prevenidos pelos antioxidantes resveratrol, coenzima Q10 e creatina. Essa conclusão é reforçada pelo fato de que o ditioneitol (DTT), potente agente redutor, também não ter sido capaz de prevenir a indução da abertura do PTP pelo Myr em coração, assim como o agente alquilante de tióis N-etilmaleimida (NEM) e o antioxidante melatonina que não foram capazes de prevenir a dissipação do $\Delta\Psi_m$ em mitocôndrias de músculo esquelético, bem como os antioxidantes resveratrol e coenzima Q10 nas mitocôndrias de fígado.

Também é improvável que mudanças na fluidez da membrana mitocondrial possam estar associadas com a indução ao PTP (COLELL et al., 2003; RICCHELLI et al., 1999) explicando os achados da presente investigação, uma vez que a anisotropia não foi alterada por esses metabólitos em coração e em fígado.

Uma vez que a mitocôndria é responsável por captar cálcio intracelular em situações fisiológicas e patológicas, sendo importante no controle da homeostase celular de cálcio, avaliamos se o Cis-5 e o Myr poderiam alterar esse parâmetro.

Observamos que esses ácidos graxos foram capazes de diminuir significativamente em todos os tecidos testados a capacidade de retenção de Ca^{2+} , uma importante função mitocondrial (BAUGHMAN et al., 2011; DE STEFANI et al., 2011; MARCHI; PINTON, 2014; PAN et al., 2013; PENDIN et al., 2014), especialmente em tecidos musculares, constituindo um mecanismo regulatório muito importante para a fisiologia cardíaca necessária para o funcionamento dos cardiomiócitos e o mecanismo de contração do músculo esquelético (DRAGO et al., 2012; KWONG et al., 2018). É possível que a ativação do PTP possa estar envolvida na diminuição da capacidade de retenção de Ca^{2+} , uma vez que essa condição leva à perda de elementos mitocondriais (Ca^{2+} , Mg^{2+} , GSH, NADH e NADPH), resultando numa disfunção na OXPHOS (RASOLA; BERNARDI, 2011; STARKOV, 2010; ZORATTI; SZABO, 1995). Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de que o prejuízo na capacidade de captar e reter Ca^{2+} induzido por Cis-5 e Myr também possa ser parcialmente devido ao efeito desacoplador desses ácidos graxos, levando subsequentemente a uma permeabilização não seletiva e liberação mitocondrial de Ca^{2+} .

Outras observações importantes do presente trabalho são que o Cis-5 e o Myr induziram inchamento mitocondrial e liberação de citocromo *c* em mitocôndrias de fígado carregadas de Ca^{2+} , provavelmente uma consequência da indução do PTP que está de acordo com o conceito que o colapso no $\Delta\Psi_m$ causado pela ativação do PTP é comumente associado com inchamento, onde a membrana mitocondrial interna expande mais que a externa, levando a ruptura desta última e perda de fatores apoptóticos, como citocromo *c*, que podem potencialmente provocar apoptose e/ou necrose celular (BERNARDI, P., 1999; BERNARDI, PAOLO, 2013; SKULACHEV, V. P., 1996).

O conteúdo de NAD(P)H da matriz mitocondrial de coração também foi muito diminuído pelos Cis-5 e Myr na ausência de Ca^{2+} . Nesse particular, é pouco provável que essa redução ocorreu por oxidação dos equivalentes reduzidos causada por espécies reativas porque esses ácidos foram incapazes de causar estresse oxidativo no coração, levando-se então à possibilidade de que essa redução ocorreu devido ao efeito desacoplador desses ácidos graxos.

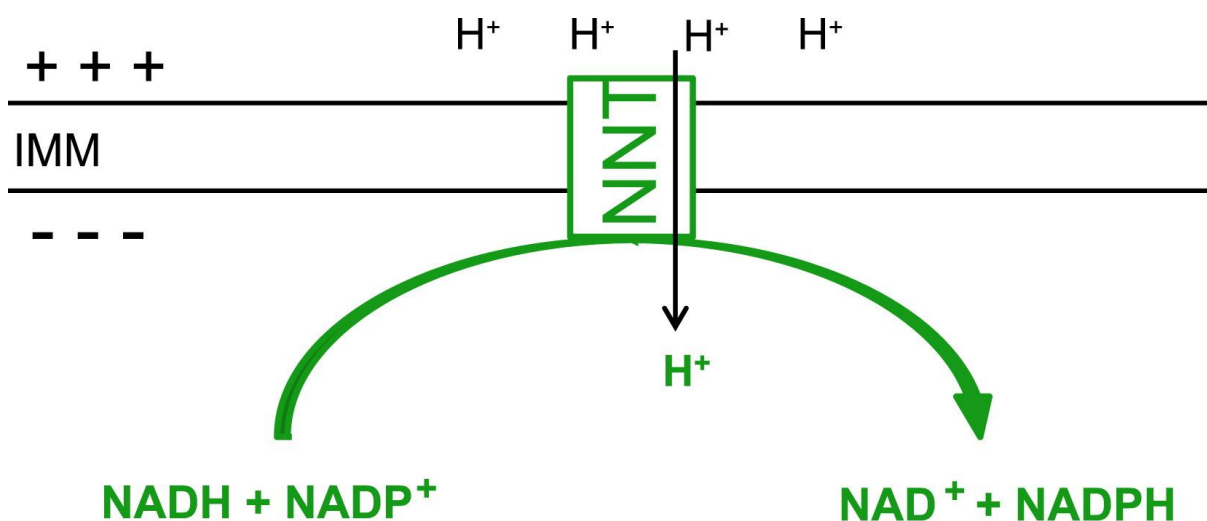


Figura 6. Esquema da reação catalizada pela transidrogenase mitocondrial de nucleotídeos de nicotinamida (NNT). NNT está embebida na membrana mitocondrial interna (IMM) e transloca H^+ para a matriz enquanto NADP^+ é reduzido com o gasto de NADH da matriz. O gradiente eletroquímico através da IMM desloca o equilíbrio da reação para a direita (adaptado de RONCHI et al. (2013)).

Enfatize-se que a inibição metabólica demonstrada no presente trabalho pela redução do estado 3 da respiração mitocondrial, bem como da síntese de ATP e do conteúdo de equivalentes reduzidos NAD(P)H mitocondrial pode provocar uma diminuição da razão NADH/NAD. Nessas condições, o sentido da reação da enzima transidrogenase mitocondrial de nucleotídeos de nicotinamida (NNT), que usualmente converte o NADH em NADPH, fica invertido (figura 6) (RYDSTROM, 2006). Na forma reversa da NNT, ocorre consumo de NADPH para formar NADH com o objetivo de manter o metabolismo energético, resultando na formação do produto oxidado NADP (NICKEL et al., 2015). Por sua vez, o NADPH é importante

na manutenção do estado redox e da defesa mitocondrial contra o estresse oxidativo por atuar como cofator e agente redutor na regeneração dos sistemas antioxidantes glutathiona redutase/peroxidase e tioredoxina redutase/peroxiredoxina (NICKEL et al., 2015) (KOWALTOWSKI et al., 2009; VOGEL et al., 1999; YIN; SANCHETI; CADENAS, 2012). Estudos prévios demonstraram que quando a mitocôndria está energizada e as concentrações de NADPH altas, o processo de abertura do PTP é inibido; em contrapartida, quando o NADP está oxidado a abertura do PTP é favorecida (CASTILHO et al., 1995; VERCESI, 1987). Portanto, não podemos excluir a possibilidade de que em condições de disfunção mitocondrial, a depleção de NADPH causada pelo modo reverso da NNT pode potencialmente induzir a transição de permeabilidade mitocondrial, agravando a disfunção mitocondrial causada por Cis-5 e Myr. Por outro lado, uma vez que desacopladores comumente provocam oxidação do NADH, não podemos descartar que o efeito desacoplador de Cis-5 e Myr também pode contribuir para levar a enzima NTT a atuar no seu modo reverso.

Nossos resultados *in vitro* obtidos em preparações mitocondriais foram reproduzidos por métodos *in situ* em sistemas celulares, consistindo de fibras musculares esqueléticas e cardíacas, bem como de células cardíacas e hepáticas que permitem avaliar de forma mais fisiológica a funcionalidade mitocondrial em um sistema celular (KUZNETSOV et al., 2008). Observamos que o Cis-5 e o Myr comprometeram a bioenergética cardíaca nas fibras musculares, tanto quanto nos cardiomiócitos, bem como nos hepatócitos e fibras musculares esqueléticas, ao provocarem uma inibição do estado 3 e da respiração desacoplada. É importante enfatizar que os nossos resultados em células foram obtidos em condições experimentais com uma concentração de albumina baixa, similar àquela encontrada

no citosol hepático (BARAONA et al., 1977), implicando que os efeitos causados sejam atribuídos às suas formas livres ativas.

É difícil estabelecer a relevância fisiopatológica dos achados do presente trabalho porque as concentrações de Cis-5 e Myr nos tecidos dos pacientes deficientes de VLCAD ainda são desconhecidas. Entretanto, deve ser notado que os efeitos mitotóxicos foram observados com concentrações patológicas desses ácidos graxos acumulados similares às aquelas encontradas no plasma dos pacientes afetados durante descompensação metabólica (5 a 500 μM) (COSTA et al., 1998; LAFORET et al., 2009). Ao contrário, concentrações fisiológicas do Cis-5 e do Myr não alteraram os parâmetros testados, ressaltando sua toxicidade somente em concentrações patológicas. Vale ainda a pena mencionar que o coração, o músculo esquelético e o fígado utilizam principalmente como fonte de energia os ácidos graxos, sendo que as enzimas do catabolismo dos LCFA estão muito expressas nesses tecidos (OEY et al., 2005; OLPIN, 2013).

O presente trabalho reforça a hipótese de que o acúmulo de Cis-5 e Myr prejudica funções mitocondriais cruciais, que pode contribuir para os fenótipos clínicos característicos dos pacientes afetados pela VLCADD. É concebível que o dano das funções mitocondriais causados pelos Cis-5 e Myr pode ser maior *in vivo* em situações de estresse metabólico, em que as concentrações desses metabólitos no meio intracelular são superiores às encontradas no plasma, já que estão acumulados dentro da célula, em pacientes afetados por essa doença. Nesse sentido, foi verificado que as concentrações das acilcarnitinas de cadeia longa acumuladas no modelo animal da VLCADD são maiores no fígado e músculo esquelético do que no plasma dos animais nocaute (SPIEKERKOETTER et al., 2005).

Finalmente, postulamos que o déficit energético na VLCADD, além de ser causado pela falta de oxidação dos LCFA em tecidos ricos em mitocôndrias (coração, fígado e músculo esquelético), é agravado pela lipotoxicidade dos principais ácidos graxos acumulados nessa doença, inibindo propriedades cruciais da mitocôndria e que esses mecanismos estão envolvidos na sua patogênese.

4. CONCLUSÕES

O Cis-5, principal marcador bioquímico usado para o diagnóstico da VLCADD, e o Myr prejudicam a bioenergética mitocondrial e a homeostase do Ca^{2+} , atuando como potentes inibidores metabólicos, desacopladores, comprometendo a OXPHOS, além de serem indutores do PTP e causar a liberação de citocromo c que pode levar a apoptose em músculo cardíaco e esquelético, bem como em fígado de ratos jovens (figura 7).

No que se refere à respiração celular, observamos que ambos ácidos graxos causam diminuição no estado 3, estado desacoplado e RCR, além de aumentar o estado 4, utilizando vários substratos, bem como também foram capazes de diminuir a produção de ATP em mitocôndrias de coração, fígado e músculo esquelético.

Nossos resultados *in vitro* obtidos das frações mitocondriais foram reproduzidos em sistemas celulares (fibras cardíacas e musculares esqueléticas, cardiomiócitos e hepatócitos) que mais mimetizam o meio intracelular *in vivo*.

Também verificamos que o Cis-5 e o Myr diminuem o potencial de membrana e a capacidade de retenção de cálcio em mitocôndrias de coração, fígado e músculo esquelético, assim como o conteúdo de NAD(P)H em coração e causam inchamento mitocondrial com a liberação de citocromo c em fígado. Alguns desses efeitos foram prevenidos pelos inibidores da abertura do PTP, indicando que esse mecanismo está envolvido nos efeitos observados.

Além disso, observamos que ocorreu uma inibição do complexo I da cadeia respiratória em mitocôndrias de coração e do complexo I-III em fígado e músculo esquelético, e também da enzima α -cetoglutarato desidrogenase em fígado, o que pode explicar em parte as inibições observadas na respiração mitocondrial.

Não houve alterações nas outras atividades enzimáticas e complexos testados, nem na fluidez de membrana.

Propomos que a mitotoxicidade causada por esses ácidos graxos que mais se acumulam na VLCADD pode estar associada com as alterações de bioenergética mitocondrial encontradas em tecidos de camundongos do modelo genético animal de VLCADD.

Presumimos que nossos achados podem estar associados com as manifestações cardíacas, hepáticas e musculares que ocorrem nos pacientes afetados pela VLCADD, especialmente durante crises metabólicas caracterizadas por um aumento significativo dos ácidos graxos acumulados nos tecidos dos pacientes.

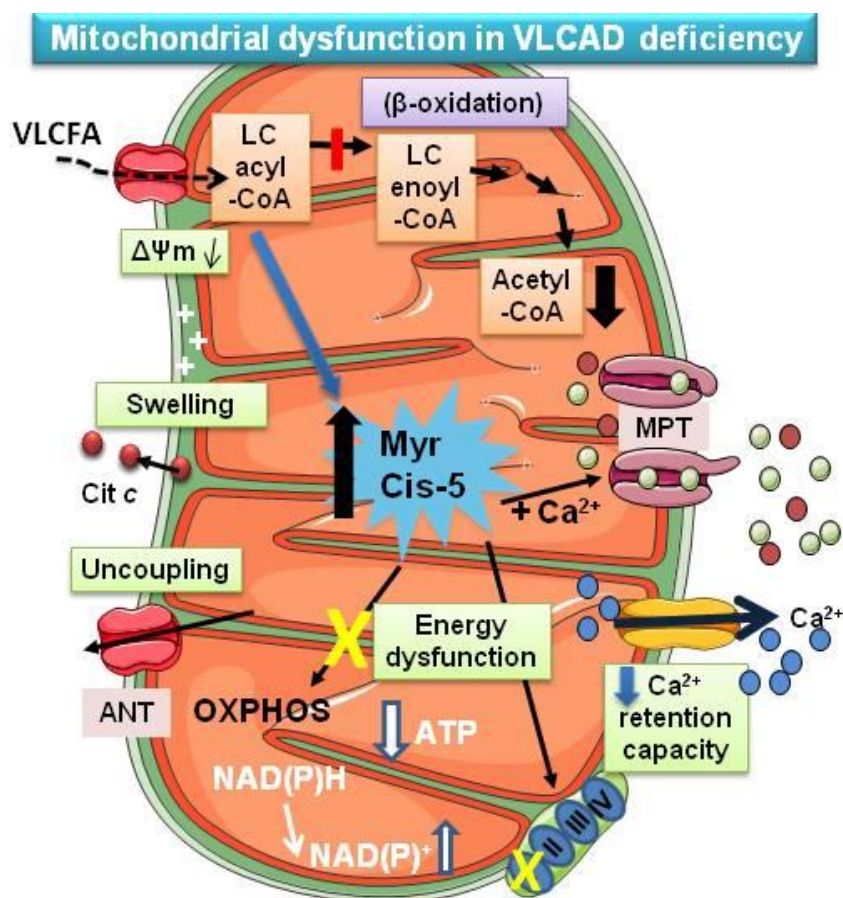


Figura 7. Disfunção mitocondrial na deficiência da VLCAD. O bloqueio da β-oxidação causado pela deficiência da VLCAD leva ao acúmulo de ácidos graxos, principalmente Myr e Cis-5. Esses metabólitos causam diminuição do $\Delta\Psi_m$, inchamento mitocondrial, liberação de citocromo c,

desacoplamento com auxílio do ANT. Causam disfunção energética com inibição da OXPHOS, atividades dos complexos I e I-III, diminuição da produção de ATP e do conteúdo de NAD(P)H, além de induzirem a abertura do PTP (MPT) e diminuir a capacidade de retenção de Ca^{2+} . Fonte: própria autoria.

5. PERSPECTIVAS

- Avaliar a bioenergética mitocondrial nos moldes do presente trabalho em vários tecidos de camundongos nocaute para a VLCAD, bem como em fibroblastos e músculo esquelético de pacientes portadores da VLCADD;
- Avaliar o papel das acilcarnitinas de cadeia longa e dos seus derivados acil-CoA, que também são encontrados em altas concentrações no sangue desses pacientes, sobre a homeostase mitocondrial;

REFERÊNCIAS

- ABELES, R. H.; FREY, P. A.; JENKS, W. P. **Biochemistry**. London: Jones and Bartlett, 1992.
- ADAM-VIZI, V.; STARKOV, A. A. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. **J Alzheimers Dis**, v. 20 Suppl 2, p. S413-26, 2010.
- AFFOURTIT, C.; CRICHTON, P. G.; PARKER, N.; BRAND, M. D. Novel uncoupling proteins. **Novartis Found Symp**, v. 287, p. 70-80; discussion 80-91, 2007.
- ARNOLD, G. L. Inborn errors of metabolism in the 21(st) century: past to present. **Ann Transl Med**, v. 6, n. 24, p. 467, Dec 2018.
- ARNOLD, G. L.; VAN HOVE, J.; FREEDENBERG, D.; STRAUSS, A.; LONGO, N.; BURTON, B.; GARGANTA, C.; FICICIOGLU, C.; CEDERBAUM, S.; HARDING, C.; BOLES, R. G.; MATERN, D.; CHAKRABORTY, P.; FEIGENBAUM, A. A Delphi clinical practice protocol for the management of very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Mol Genet Metab**, v. 96, n. 3, p. 85-90, Mar 2009.
- BAINES, C. P.; KAISER, R. A.; PURCELL, N. H.; BLAIR, N. S.; OSINSKA, H.; HAMBLETON, M. A.; BRUNSKILL, E. W.; SAYEN, M. R.; GOTTLIEB, R. A.; DORN, G. W.; ROBBINS, J.; MOLKENTIN, J. D. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. **Nature**, v. 434, n. 7033, p. 658-62, Mar 31 2005.
- BAKERMANS, A. J.; DODD, M. S.; NICOLAY, K.; PROMPERS, J. J.; TYLER, D. J.; HOUTEN, S. M. Myocardial energy shortage and unmet anaplerotic needs in the fasted long-chain acyl-CoA dehydrogenase knockout mouse. **Cardiovasc Res**, v. 100, n. 3, p. 441-9, Dec 1 2013.
- BARAONA, E.; LEO, M. A.; BOROWSKY, S. A.; LIEBER, C. S. Pathogenesis of alcohol-induced accumulation of protein in the liver. **J Clin Invest**, v. 60, n. 3, p. 546-54, Sep 1977.
- BASSO, E.; FANTE, L.; FOWLKES, J.; PETRONILLI, V.; FORTE, M. A.; BERNARDI, P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. **J Biol Chem**, v. 280, n. 19, p. 18558-61, May 13 2005.
- BAUGHMAN, J. M.; PEROCCHI, F.; GIRGIS, H. S.; PLOVANICH, M.; BELCHER-TIMME, C. A.; SANCAK, Y.; BAO, X. R.; STRITTMATTER, L.; GOLDBERGER, O.; BOGORAD, R. L.; KOTELIANSKY, V.; MOOTHA, V. K. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**, v. 476, n. 7360, p. 341-5, Aug 18 2011.
- BERNARDI, P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1127-55, Oct 1999.

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

BERNARDI, P.; VON STOCKUM, S. The permeability transition pore as a Ca²⁺ release channel: new answers to an old question. **Cell Calcium**, v. 52, n. 1, p. 22-7, Jul 2012.

BLEEKER, J. C.; KOK, I. L.; FERDINANDUSSE, S.; VAN DER POL, W. L.; CUPPEN, I.; BOSCH, A. M.; LANGEVELD, M.; DERKS, T. G. J.; WILLIAMS, M.; DE VRIES, M.; MULDER, M. F.; GOZALBO, E. R.; DE SAIN-VAN DER VELDEN, M. G. M.; RENNINGS, A. J.; SCHIELEN, P.; DEKKERS, E.; HOUTKOOOPER, R. H.; WATERHAM, H. R.; PRAS-RAVES, M. L.; WANDERS, R. J. A.; VAN HASSELT, P. M.; SCHOENMAKERS, M.; WIJBURG, F. A.; VISSER, G. Impact of newborn screening for very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency on genetic, enzymatic, and clinical outcomes. **J Inherit Metab Dis**, v. 42, n. 3, p. 414-423, May 2019.

BODROVA, M. E.; BRAILOVSKAYA, I. V.; EFRON, G. I.; STARKOV, A. A.; MOKHOVA, E. N. Cyclosporin A-sensitive decrease in the transmembrane potential across the inner membrane of liver mitochondria induced by low concentrations of fatty acids and Ca²⁺. **Biochemistry (Mosc)**, v. 68, n. 4, p. 391-8, Apr 2003.

BODROVA, M. E.; DEDUKHOVA, V. I.; SAMARTSEV, V. N.; MOKHOVA, E. N. Role of the ADP/ATP-antiporter in fatty acid-induced uncoupling of Ca²⁺-loaded rat liver mitochondria. **IUBMB Life**, v. 50, n. 3, p. 189-94, Sep 2000.

BONNEFONT, J. P.; BASTIN, J.; LAFORET, P.; AUBEY, F.; MOGENET, A.; ROMANO, S.; RICQUIER, D.; GOBIN-LIMBALLE, S.; VASSAULT, A.; BEHIN, A.; EYMARD, B.; BRESSON, J. L.; DJOUADI, F. Long-term follow-up of bezafibrate treatment in patients with the myopathic form of carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency. **Clin Pharmacol Ther**, v. 88, n. 1, p. 101-8, Jul 2010.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 222-30, Aug 2000.

CARPENTER, K.; POLLITT, R. J.; MIDDLETON, B. Human liver long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is a multifunctional membrane-bound beta-oxidation enzyme of mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 183, n. 2, p. 443-8, Mar 16 1992.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; MEINICKE, A. R.; BECHARA, E. J.; VERCESI, A. E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 18, n. 3, p. 479-86, Mar 1995.

CHAE, H. Z.; KIM, H. J.; KANG, S. W.; RHEE, S. G. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 45, n. 2-3, p. 101-12, Sep 1999.

CHILDS, B.; VALLE, D.; JIMENEZ-SANCHEZ, G. The Inborn Error and Biochemical Individuality. In: BEAUDET, A. L.; VOGELSTEIN, B., *et al* (Ed.). **The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2014.

COLELL, A.; GARCIA-RUIZ, C.; LLUIS, J. M.; COLL, O.; MARI, M.; FERNANDEZ-CHECA, J. C. Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. **J Biol Chem**, v. 278, n. 36, p. 33928-35, Sep 5 2003.

COSTA, C. G.; DORLAND, L.; HOLWERDA, U.; DE ALMEIDA, I. T.; POLL-THE, B. T.; JAKOBS, C.; DURAN, M. Simultaneous analysis of plasma free fatty acids and their 3-hydroxy analogs in fatty acid beta-oxidation disorders. **Clin Chem**, v. 44, n. 3, p. 463-71, Mar 1998.

CROMPTON, M.; VIRJI, S.; DOYLE, V.; JOHNSON, N.; WARD, J. M. The mitochondrial permeability transition pore. **Biochem Soc Symp**, v. 66, p. 167-79, 1999.

DE STEFANI, D.; RAFFAELLO, A.; TEARDO, E.; SZABO, I.; RIZZUTO, R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**, v. 476, n. 7360, p. 336-40, Aug 18 2011.

DI DONATO, S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. **J Inherit Metab Dis**, v. 23, n. 3, p. 247-63, May 2000.

DIEKMAN, E. F.; VAN DER POL, W. L.; NIEVELSTEIN, R. A.; HOUTEN, S. M.; WIJBURG, F. A.; VISSER, G. Muscle MRI in patients with long-chain fatty acid oxidation disorders. **J Inherit Metab Dis**, v. 37, n. 3, p. 405-13, May 2014.

DRAGO, I.; DE STEFANI, D.; RIZZUTO, R.; POZZAN, T. Mitochondrial Ca²⁺ uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca²⁺ peaks in cardiomyocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 32, p. 12986-91, Aug 7 2012.

EATON, S.; BARTLETT, K.; POURFARZAM, M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. **Biochem J**, v. 320 (Pt 2), p. 345-57, Dec 1 1996.

ENGBERS, H. M.; DORLAND, L.; DE SAIN, M. G.; ESKES, P. F.; VISSER, G. Rhabdomyolysis in early-onset very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency despite normal glucose after fasting. **J Inherit Metab Dis**, v. 28, n. 6, p. 1151-2, 2005.

EXIL, V. J.; GARDNER, C. D.; ROTTMAN, J. N.; SIMS, H.; BARTELD, B.; KHUCHUA, Z.; SINDHAL, R.; NI, G.; STRAUSS, A. W. Abnormal mitochondrial bioenergetics and heart rate dysfunction in mice lacking very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 3, p. H1289-97, Mar 2006.

EXIL, V. J.; ROBERTS, R. L.; SIMS, H.; MCLAUGHLIN, J. E.; MALKIN, R. A.; GARDNER, C. D.; NI, G.; ROTTMAN, J. N.; STRAUSS, A. W. Very-long-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency in mice. **Circ Res**, v. 93, n. 5, p. 448-55, Sep 5 2003.

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. A.; CASTILHO, R. F.; FERREIRA, J. C.; KOWALTOWSKI, A. J.; SLUSE, F. E.; SOUZA-PINTO, N. C.; VERCESI, A. E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 16, p. 2029-74, Jun 1 2013.

FINKEL, T.; MENAZZA, S.; HOLMSTROM, K. M.; PARKS, R. J.; LIU, J.; SUN, J.; LIU, J.; PAN, X.; MURPHY, E. The ins and outs of mitochondrial calcium. **Circ Res**, v. 116, n. 11, p. 1810-9, May 22 2015.

GILLINGHAM, M. B.; HEITNER, S. B.; MARTIN, J.; ROSE, S.; GOLDSTEIN, A.; EL-GHARBAWY, A. H.; DEWARD, S.; LASAREV, M. R.; POLLARO, J.; DELANY, J. P.; BURCHILL, L. J.; GOODPASTER, B.; SHOEMAKER, J.; MATERN, D.; HARDING, C. O.; VOCKLEY, J. Triheptanoin versus trioctanoin for long-chain fatty acid oxidation disorders: a double blinded, randomized controlled trial. **J Inherit Metab Dis**, v. 40, n. 6, p. 831-843, Nov 2017.

GNAIGER, E. Mitochondrial pathways and respiratory control. **An introduction to OXPHOS analysis. 4th ed. Mitochondr Physiol Network**, v. 19, p. 80, 2014.

GOETZMAN, E. S.; WANG, Y.; HE, M.; MOHSEN, A. W.; NINNESS, B. K.; VOCKLEY, J. Expression and characterization of mutations in human very long-chain acyl-CoA dehydrogenase using a prokaryotic system. **Mol Genet Metab**, v. 91, n. 2, p. 138-47, Jun 2007.

GOGLIA, F.; SKULACHEV, V. P. A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. **FASEB J**, v. 17, n. 12, p. 1585-91, Sep 2003.

GREGERSEN, N.; ANDRESEN, B. S.; CORYDON, M. J.; CORYDON, T. J.; OLSEN, R. K.; BOLUND, L.; BROSS, P. Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship. **Hum Mutat**, v. 18, n. 3, p. 169-89, Sep 2001.

HOEK, J. B.; RYDSTROM, J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. **Biochem J**, v. 254, n. 1, p. 1-10, Aug 15 1988.

HOUTEN, S. M.; WANDERS, R. J. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. **J Inherit Metab Dis**, v. 33, n. 5, p. 469-77, Oct 2010.

JEANMONOD, R.; JEANMONOD, D. Inborn Errors Of Metabolism. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2018.

JLST, L.; RUITER, J. P.; HOOVERS, J. M.; JAKOBS, M. E.; WANDERS, R. J. Common missense mutation G1528C in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. Characterization and expression of the mutant protein, mutation analysis on genomic DNA and chromosomal localization of the mitochondrial trifunctional protein alpha subunit gene. **J Clin Invest**, v. 98, n. 4, p. 1028-33, Aug 15 1996.

KANDOLA, K.; BOWMAN, A.; BIRCH-MACHIN, M. A. Oxidative stress--a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. **Int J Cosmet Sci**, v. 37 Suppl 2, p. 1-8, Dec 2015.

KOMPARE, M.; RIZZO, W. B. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. **Semin Pediatr Neurol**, v. 15, n. 3, p. 140-9, Sep 2008.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, v. 495, n. 1-2, p. 12-5, Apr 20 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 4, p. 333-43, Aug 15 2009.

KUZNETSOV, A. V.; VEKSLER, V.; GELLERICH, F. N.; SAKS, V.; MARGREITER, R.; KUNZ, W. S. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 965-76, 2008.

KWONG, J. Q.; HUO, J.; BROUND, M. J.; BOYER, J. G.; SCHWANKEKAMP, J. A.; GHAZAL, N.; MAXWELL, J. T.; JANG, Y. C.; KHUCHUA, Z.; SHI, K.; BERS, D. M.; DAVIS, J.; MOLKENTIN, J. D. The mitochondrial calcium uniporter underlies metabolic fuel preference in skeletal muscle. **JCI Insight**, v. 3, n. 22, Nov 15 2018.

LAFORÉ, P.; ACQUAVIVA-BOURDAIN, C.; RIGAL, O.; BRIVET, M.; PENISSON-BESNIER, I.; CHABROL, B.; CHAIGNE, D.; BOESPFLUG-TANGUY, O.; LAROCHE, C.; BEDAT-MILLET, A. L.; BEHIN, A.; DELEVAUX, I.; LOMBES, A.; ANDRESEN, B. S.; EYMARD, B.; VIANEY-SABAN, C. Diagnostic assessment and long-term follow-up of 13 patients with Very Long-Chain Acyl-Coenzyme A dehydrogenase (VLCAD) deficiency. **Neuromuscul Disord**, v. 19, n. 5, p. 324-9, May 2009.

LEHNINGER, A. L.; VERCESI, A.; BABABUNMI, E. A. Regulation of Ca²⁺ release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 4, p. 1690-4, Apr 1978.

LINDNER, M.; HOFFMANN, G. F.; MATERN, D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. **J Inherit Metab Dis**, v. 33, n. 5, p. 521-6, Oct 2010.

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, n. 1, p. 147-57, Jul 12 1996.

MACIEL, E. N.; KOWALTOWSKI, A. J.; SCHWALM, F. D.; RODRIGUES, J. M.; SOUZA, D. O.; VERCESI, A. E.; WAJNER, M.; CASTILHO, R. F. Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition. **J Neurochem**, v. 90, n. 5, p. 1025-35, Sep 2004.

MAK, C. M.; LEE, H. C.; CHAN, A. Y.; LAM, C. W. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 50, n. 6, p. 142-62, Nov 2013.

MARCHI, S.; PINTON, P. The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. **J Physiol**, v. 592, n. 5, p. 829-39, Mar 1 2014.

MATHUR, A.; SIMS, H. F.; GOPALAKRISHNAN, D.; GIBSON, B.; RINALDO, P.; VOCKLEY, J.; HUG, G.; STRAUSS, A. W. Molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing pediatric cardiomyopathy and sudden death. **Circulation**, v. 99, n. 10, p. 1337-43, Mar 16 1999.

MC, O. R.; NORGAARD, M. G.; SACCHETTI, M.; VAN ENGELEN, B. G.; VISSING, J. Fuel utilization in patients with very long-chain acyl-coa dehydrogenase deficiency. **Ann Neurol**, v. 56, n. 2, p. 279-83, Aug 2004.

MERRITT, J. L., 2ND; NORRIS, M.; KANUNGO, S. Fatty acid oxidation disorders. **Ann Transl Med**, v. 6, n. 24, p. 473, Dec 2018.

MIRANDOLA, S. R.; MELO, D. R.; SAITO, A.; CASTILHO, R. F. 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. **J Neurosci Res**, v. 88, n. 3, p. 630-9, Feb 15 2010.

MITCHELL, G. A.; FUKAO, T. Inborn Errors of Ketone Body Metabolism. In: BEAUDET, A. L.; VOGELSTEIN, B., *et al* (Ed.). **The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2014.

MOKHOVA, E. N.; KHAILOVA, L. S. Involvement of mitochondrial inner membrane anion carriers in the uncoupling effect of fatty acids. **Biochemistry (Mosc)**, v. 70, n. 2, p. 159-63, Feb 2005.

MOORE, C. L. Specific inhibition of mitochondrial Ca⁺⁺ transport by ruthenium red. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 42, n. 2, p. 298-305, Jan 22 1971.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 7th. New York: WH Freeman, 2017. ISBN 1319108245.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics**. 4th. Boston: Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-388425-1.

NICKEL, A. G.; VON HARDENBERG, A.; HOHL, M.; LOFFLER, J. R.; KOHLHAAS, M.; BECKER, J.; REIL, J. C.; KAZAKOV, A.; BONNEKOH, J.; STADELMAIER, M.; PUHL, S. L.; WAGNER, M.; BOGESKI, I.; CORTASSA, S.; KAPPL, R.; PASIEKA, B.; LAFONTAINE, M.; LANCASTER, C. R.; BLACKER, T. S.; HALL, A. R.; DUCHEN, M. R.; KASTNER, L.; LIPP, P.; ZELLER, T.; MULLER, C.; KNOPP, A.; LAUFS, U.; BOHM, M.; HOTH, M.; MAACK, C. Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. **Cell Metab**, v. 22, n. 3, p. 472-84, Sep 1 2015.

OEY, N. A.; DEN BOER, M. E.; WIJBURG, F. A.; VEKEMANS, M.; AUGÉ, J.; STEINER, C.; WANDERS, R. J.; WATERHAM, H. R.; RUITER, J. P.; ATTIE-BITACH, T. Long-chain fatty acid oxidation during early human development. **Pediatr Res**, v. 57, n. 6, p. 755-9, Jun 2005.

OLPIN, S. E. Pathophysiology of fatty acid oxidation disorders and resultant phenotypic variability. **J Inherit Metab Dis**, v. 36, n. 4, p. 645-58, Jul 2013.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 460, n. 1, p. 72-81, Apr 24 2015.

PAMPOLS, T. Inherited metabolic rare disease. **Adv Exp Med Biol**, v. 686, p. 397-431, 2010.

PAN, X.; LIU, J.; NGUYEN, T.; LIU, C.; SUN, J.; TENG, Y.; FERGUSSON, M. M.; ROVIRA, II; ALLEN, M.; SPRINGER, D. A.; APONTE, A. M.; GUCEK, M.; BALABAN, R. S.; MURPHY, E.; FINKEL, T. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 12, p. 1464-72, Dec 2013.

PENDIN, D.; GREOTTI, E.; POZZAN, T. The elusive importance of being a mitochondrial Ca(2+) uniporter. **Cell Calcium**, v. 55, n. 3, p. 139-45, Mar 2014.

POTTECHER, J.; GUILLOT, M.; BELAIDI, E.; CHARLES, A. L.; LEJAY, A.; GHARIB, A.; DIEMUNSCH, P.; GENY, B. Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. **J Vasc Surg**, v. 57, n. 4, p. 1100-1108 e2, Apr 2013.

PRIMASSIN, S.; TUCCI, S.; HEREBIAN, D.; SEIBT, A.; HOFFMANN, L.; TER VELD, F.; SPIEKERKOETTER, U. Pre-exercise medium-chain triglyceride application prevents acylcarnitine accumulation in skeletal muscle from very-long-chain acyl-CoA-dehydrogenase-deficient mice. **J Inherit Metab Dis**, v. 33, n. 3, p. 237-46, Jun 2010.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**, v. 50, n. 3, p. 222-33, Sep 2011.

RICCHELLI, F.; GOBBO, S.; MORENO, G.; SALET, C. Changes of the fluidity of mitochondrial membranes induced by the permeability transition. **Biochemistry**, v. 38, n. 29, p. 9295-300, Jul 20 1999.

RIZZUTO, R.; DE STEFANI, D.; RAFFAELLO, A.; MAMMUCARI, C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 9, p. 566-78, Sep 2012.

ROE, C. R.; DING, J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: SCRIVER;CHILDS, *et al* (Ed.). **The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, 2005.

ROE, C. R.; SWEETMAN, L.; ROE, D. S.; DAVID, F.; BRUNENGRABER, H. Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride. **J Clin Invest**, v. 110, n. 2, p. 259-69, Jul 2002.

RONCHI, J. A.; FIGUEIRA, T. R.; RAVAGNANI, F. G.; OLIVEIRA, H. C.; VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. **Free Radic Biol Med**, v. 63, p. 446-56, Oct 2013.

ROTTENBERG, H.; MARBACH, M. Adenine nucleotides regulate Ca²⁺ transport in brain mitochondria. **FEBS Lett**, v. 247, n. 2, p. 483-6, Apr 24 1989.

RYDSTROM, J. Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1757, n. 5-6, p. 721-6, May-Jun 2006.

SAITO, A.; CASTILHO, R. F. Inhibitory effects of adenine nucleotides on brain mitochondrial permeability transition. **Neurochem Res**, v. 35, n. 11, p. 1667-74, Nov 2010.

SAMARTSEV, V. N.; MARCHIK, E. I.; SHAMAGULOVA, L. V. Free fatty acids as inducers and regulators of uncoupling of oxidative phosphorylation in liver mitochondria with participation of ADP/ATP- and aspartate/glutamate-antiporter. **Biochemistry (Mosc)**, v. 76, n. 2, p. 217-24, Feb 2011.

SAUDUBRAY, J. M.; MARTIN, D.; DE LONLAY, P.; TOUATI, G.; POGGI-TRAVERT, F.; BONNET, D.; JOUVET, P.; BOUTRON, M.; SLAMA, A.; VIANEY-SABAN, C.; BONNEFONT, J. P.; RABIER, D.; KAMOUN, P.; BRIVET, M. Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. **J Inherit Metab Dis**, v. 22, n. 4, p. 488-502, Jun 1999.

SCHIFF, M.; MOHSEN, A. W.; KARUNANIDHI, A.; MCCRACKEN, E.; YEASTED, R.; VOCKLEY, J. Molecular and cellular pathology of very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Mol Genet Metab**, v. 109, n. 1, p. 21-7, May 2013.

SCHONFELD, P. Anion permeation limits the uncoupling activity of fatty acids in mitochondria. **FEBS Lett**, v. 303, n. 2-3, p. 190-2, Jun 1 1992.

SCHONFELD, P.; BOHNENSACK, R. Fatty acid-promoted mitochondrial permeability transition by membrane depolarization and binding to the ADP/ATP carrier. **FEBS Lett**, v. 420, n. 2-3, p. 167-70, Dec 29 1997.

SCHONFELD, P.; JEZEK, P.; BELYAEVA, E. A.; BORECKY, J.; SLYSHENKOV, V. S.; WIECKOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Photomodification of mitochondrial proteins by azido fatty acids and its effect on mitochondrial energetics. Further evidence for the role of the ADP/ATP carrier in fatty-acid-mediated uncoupling. **Eur J Biochem**, v. 240, n. 2, p. 387-93, Sep 1 1996.

SCHONFELD, P.; SCHILD, L.; KUNZ, W. Long-chain fatty acids act as protonophoric uncouplers of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, v. 977, n. 3, p. 266-72, Dec 7 1989.

SCHONFELD, P.; WIECKOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Long-chain fatty acid-promoted swelling of mitochondria: further evidence for the protonophoric effect of fatty acids in the inner mitochondrial membrane. **FEBS Lett**, v. 471, n. 1, p. 108-12, Apr 7 2000.

SCRIVER, C.; BEAUDET, A.; SLY, W.; VALLE, D.; CHILDS, B.; KINZLER, K.; VOGELSTEIN, B. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. 8. New York: McGraw-Hill, 2001.

SKULACHEV, V. P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. **FEBS Lett**, v. 397, n. 1, p. 7-10, Nov 11 1996.

SKULACHEV, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim Biophys Acta**, v. 1363, n. 2, p. 100-24, Feb 25 1998.

SMITH, E. H.; MATERN, D. Acylcarnitine analysis by tandem mass spectrometry. **Curr Protoc Hum Genet**, v. Chapter 17, p. Unit 17 8 1-20, Jan 2010.

SPIEKERKOETTER, U. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: clinical presentation of long-chain fatty acid oxidation defects before and after newborn screening. **J Inherit Metab Dis**, v. 33, n. 5, p. 527-32, Oct 2010.

SPIEKERKOETTER, U.; BASTIN, J.; GILLINGHAM, M.; MORRIS, A.; WIJBURG, F.; WILCKEN, B. Current issues regarding treatment of mitochondrial fatty acid oxidation disorders. **J Inherit Metab Dis**, v. 33, n. 5, p. 555-61, Oct 2010.

SPIEKERKOETTER, U.; BENNETT, M. J.; BEN-ZEEV, B.; STRAUSS, A. W.; TEIN, I. Peripheral neuropathy, episodic myoglobinuria, and respiratory failure in deficiency of the mitochondrial trifunctional protein. **Muscle Nerve**, v. 29, n. 1, p. 66-72, Jan 2004.

SPIEKERKOETTER, U.; LINDNER, M.; SANTER, R.; GROTZKE, M.; BAUMGARTNER, M. R.; BOEHLES, H.; DAS, A.; HAASE, C.; HENNERMANN, J. B.; KARALL, D.; DE KLERK, H.; KNERR, I.; KOCH, H. G.; PLECKO, B.; ROSCHINGER, W.; SCHWAB, K. O.; SCHEIBLE, D.; WIJBURG, F. A.; ZSCHOCKE, J.; MAYATEPEK, E.; WENDEL, U. Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop. **J Inherit Metab Dis**, v. 32, n. 4, p. 488-97, Aug 2009.

SPIEKERKOETTER, U.; LINDNER, M.; SANTER, R.; GROTZKE, M.; BAUMGARTNER, M. R.; BOEHLES, H.; DAS, A.; HAASE, C.; HENNERMANN, J. B.; KARALL, D.; KLERK, H. D.; KNERR, I.; KOCH, H. G.; PLECKO, B.; RÖSCHINGER, W.; SCHWAB, K. O.; SCHEIBLE, D.; WIJBURG, F. A.; ZSCHOCKE, J.; MAYATEPEK, E.; WENDEL, U. Treatment recommendations in long-chain fatty acid oxidation defects: consensus from a workshop. **J Inherit Metab Dis**, v. 32, n. 4, p. 498-505, Aug 2009.

SPIEKERKOETTER, U.; RUITER, J.; TOKUNAGA, C.; WENDEL, U.; MAYATEPEK, E.; WIJBURG, F. A.; STRAUSS, A. W.; WANDERS, R. J. Evidence for impaired gluconeogenesis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice. **Horm Metab Res**, v. 38, n. 10, p. 625-30, Oct 2006.

SPIEKERKOETTER, U.; SUN, B.; ZYTKOVICZ, T.; WANDERS, R.; STRAUSS, A. W.; WENDEL, U. MS/MS-based newborn and family screening detects asymptomatic patients with very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **J Pediatr**, v. 143, n. 3, p. 335-42, Sep 2003.

SPIEKERKOETTER, U.; TOKUNAGA, C.; WENDEL, U.; MAYATEPEK, E.; IJLST, L.; VAZ, F. M.; VAN VLIES, N.; OVERMARS, H.; DURAN, M.; WIJBURG, F. A.; WANDERS, R. J.; STRAUSS, A. W. Tissue carnitine homeostasis in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice. **Pediatr Res**, v. 57, n. 6, p. 760-4, Jun 2005.

SPIEKERKOETTER, U.; WOOD, P. A. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: pathophysiological studies in mouse models. **J Inherit Metab Dis**, v. 33, n. 5, p. 539-46, Oct 2010.

STARKOV, A. A. The molecular identity of the mitochondrial Ca²⁺ sequestration system. **FEBS J**, v. 277, n. 18, p. 3652-63, Sep 2010.

TANVEER, A.; VIRJI, S.; ANDREEVA, L.; TOTTY, N. F.; HSUAN, J. J.; WARD, J. M.; CROMPTON, M. Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. **Eur J Biochem**, v. 238, n. 1, p. 166-72, May 15 1996.

TER VELD, F.; JACOBY, C.; FLOEGEL, U.; SPIEKERKOETTER, U. **Impaired cardiac function in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient mice as studied by in-vivo NMR.** Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism: Journal of Inherited Metabolic Disease. 30: 51 p. 2007.

TONIN, A. M.; AMARAL, A. U.; BUSANELLO, E. N.; GASPAROTTO, J.; GELAIN, D. P.; GREGERSEN, N.; WAJNER, M. Mitochondrial bioenergetics deregulation caused by long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain: a possible role of mPTP opening as a pathomechanism in these disorders? **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 9, p. 1658-67, Sep 2014.

TUCCI, S.; FLOEGEL, U.; HERMANN, S.; STURM, M.; SCHAFERS, M.; SPIEKERKOETTER, U. Development and pathomechanisms of cardiomyopathy in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD(-/-)) mice. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 5, p. 677-85, May 2014.

TUCCI, S.; PEARSON, S.; HEREBIAN, D.; SPIEKERKOETTER, U. Long-term dietary effects on substrate selection and muscle fiber type in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD(-/-)) mice. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 4, p. 509-16, Apr 2013.

TUCCI, S.; PRIMASSIN, S.; TER VELD, F.; SPIEKERKOETTER, U. Medium-chain triglycerides impair lipid metabolism and induce hepatic steatosis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)-deficient mice. **Mol Genet Metab**, v. 101, n. 1, p. 40-7, Sep 2010.

TYNI, T.; MAJANDER, A.; KALIMO, H.; RAPOLA, J.; PIHKO, H. Pathology of skeletal muscle and impaired respiratory chain function in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency with the G1528C mutation. **Neuromuscul Disord**, v. 6, n. 5, p. 327-37, Oct 1996.

VENTURA, F. V.; RUITER, J.; IJLST, L.; DE ALMEIDA, I. T.; WANDERS, R. J. Differential inhibitory effect of long-chain acyl-CoA esters on succinate and glutamate transport into rat liver mitochondria and its possible implications for long-chain fatty acid oxidation defects. **Mol Genet Metab**, v. 86, n. 3, p. 344-52, Nov 2005.

VENTURA, F. V.; RUITER, J. P.; L, I. J.; DE ALMEIDA, I. T.; WANDERS, R. J. Lactic acidosis in long-chain fatty acid beta-oxidation disorders. **J Inherit Metab Dis**, v. 21, n. 6, p. 645-54, Aug 1998.

VERCESI, A. E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca²⁺ efflux from rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, v. 252, n. 1, p. 171-8, Jan 1987.

VIANEY-SABAN, C.; DIVRY, P.; BRIVET, M.; NADA, M.; ZABOT, M. T.; MATHIEU, M.; ROE, C. Mitochondrial very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical characteristics and diagnostic considerations in 30 patients. **Clin Chim Acta**, v. 269, n. 1, p. 43-62, Jan 12 1998.

VOCKLEY, J.; BENNETT, M. J.; GILLINGHAM, M. B. Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Disorders. In: BEAUDET, A. L.; VOGELSTEIN, B., *et al* (Ed.). **The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2014.

VOCKLEY, J.; BURTON, B.; BERRY, G. T.; LONGO, N.; PHILLIPS, J.; SANCHEZ-VALLE, A.; TANPAIBOON, P.; GRUNEWALD, S.; MURPHY, E.; BOWDEN, A.; CHEN, W.; CHEN, C. Y.; CATALDO, J.; MARSDEN, D.; KAKKIS, E. Results from a 78-week, single-arm, open-label Phase 2 study to evaluate UX007 in pediatric and adult patients with severe long-chain fatty acid oxidation disorders (LC-FAOD). **J Inherit Metab Dis**, Jul 9 2018.

VOCKLEY, J.; BURTON, B.; BERRY, G. T.; LONGO, N.; PHILLIPS, J.; SANCHEZ-VALLE, A.; TANPAIBOON, P.; GRUNEWALD, S.; MURPHY, E.; HUMPHREY, R.; MAYHEW, J.; BOWDEN, A.; ZHANG, L.; CATALDO, J.; MARSDEN, D. L.; KAKKIS, E. UX007 for the treatment of long chain-fatty acid oxidation disorders: Safety and efficacy in children and adults following 24weeks of treatment. **Mol Genet Metab**, v. 120, n. 4, p. 370-377, Apr 2017.

VOCKLEY, J.; MARSDEN, D.; MCCRACKEN, E.; DEWARD, S.; BARONE, A.; HSU, K.; KAKKIS, E. Long-term major clinical outcomes in patients with long chain fatty acid oxidation disorders before and after transition to triheptanoin treatment--A retrospective chart review. **Mol Genet Metab**, v. 116, n. 1-2, p. 53-60, Sep-Oct 2015.

VOGEL, R.; WIESINGER, H.; HAMPRECHT, B.; DRINGEN, R. The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. **Neurosci Lett**, v. 275, n. 2, p. 97-100, Nov 12 1999.

WAISBREN, S. E.; LANDAU, Y.; WILSON, J.; VOCKLEY, J. Neuropsychological outcomes in fatty acid oxidation disorders: 85 cases detected by newborn screening. **Dev Disabil Res Rev**, v. 17, n. 3, p. 260-8, 2013.

WANDERS, R. J.; VREKEN, P.; DEN BOER, M. E.; WIJBURG, F. A.; VAN GENNIP, A. H.; L, I. J. Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation. **J Inherit Metab Dis**, v. 22, n. 4, p. 442-87, Jun 1999.

WATANABE, K.; YAMADA, K.; SAMESHIMA, K.; YAMAGUCHI, S. Two siblings with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) deficiency suffered from rhabdomyolysis after l-carnitine supplementation. **Mol Genet Metab Rep**, v. 15, p. 121-123, Jun 2018.

WIECKOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Involvement of the dicarboxylate carrier in the protonophoric action of long-chain fatty acids in mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 232, n. 2, p. 414-7, Mar 17 1997.

WIĘCKOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. **FEBS Lett**, v. 423, n. 3, p. 339-42, Feb 27 1998.

WILCKEN, B.; WILEY, V.; HAMMOND, J.; CARPENTER, K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. **N Engl J Med**, v. 348, n. 23, p. 2304-12, Jun 5 2003.

WINTER, S. C. Treatment of carnitine deficiency. **J Inherit Metab Dis**, v. 26, n. 2-3, p. 171-80, 2003.

WOJTCZAK, L.; WIECKOWSKI, M. R.; SCHONFELD, P. Protonophoric activity of fatty acid analogs and derivatives in the inner mitochondrial membrane: a further argument for the fatty acid cycling model. **Arch Biochem Biophys**, v. 357, n. 1, p. 76-84, Sep 1 1998.

XIONG, D.; HE, H.; JAMES, J.; TOKUNAGA, C.; POWERS, C.; HUANG, Y.; OSINSKA, H.; TOWBIN, J. A.; PUREVJAV, E.; BALSCHI, J. A.; JAVADOV, S.; MCGOWAN, F. X., JR.; STRAUSS, A. W.; KHUCHUA, Z. Cardiac-specific VLCAD deficiency induces dilated cardiomyopathy and cold intolerance. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, n. 3, p. H326-38, Feb 2014.

YARANA, C.; SRIPETCHWANDEE, J.; SANIT, J.; CHATTIPAKORN, S.; CHATTIPAKORN, N. Calcium-induced cardiac mitochondrial dysfunction is predominantly mediated by cyclosporine A-dependent mitochondrial permeability transition pore. **Arch Med Res**, v. 43, n. 5, p. 333-8, Jul 2012.

YIN, F.; SANCHETI, H.; CADENAS, E. Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways. **Antioxid Redox Signal**, v. 17, n. 12, p. 1714-27, Dec 15 2012.

ZACKOVA, M.; KRAMER, R.; JEZEK, P. Interaction of mitochondrial phosphate carrier with fatty acids and hydrophobic phosphate analogs. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 32, n. 5, p. 499-508, May 2000.

ZAGO, E. B.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. The redox state of endogenous pyridine nucleotides can determine both the degree of mitochondrial oxidative stress and the solute selectivity of the permeability transition pore. **FEBS Lett**, v. 478, n. 1-2, p. 29-33, Jul 28 2000.

ZORATTI, M.; SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim Biophys Acta**, v. 1241, n. 2, p. 139-76, Jul 17 1995.