

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

Ana Cristina Roginski

**METABÓLITOS ACUMULADOS NA ACIDEMIA PROPIÔNICA
COMPROMETEM A BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E A
HOMEOSTASE DO CÁLCIO EM CORAÇÃO E RINS DE RATOS**

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Roginski, Ana Cristina
Metabólitos acumulados na Acidemia propiônica
comprometem a bioenergética mitocondrial e a
homeostase do cálcio em coração e rins de ratos / Ana
Cristina Roginski. -- 2022.
122 f.
Orientador: Alexandre Umpierrez Amaral.

Coorientador: 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, 2022.

1. acidemia propiônica. 2. mitocôndria . 3.
bioenergética . 4. coração . 5. rim . I. Amaral,
Alexandre Umpierrez, orient. II. Wajner, Moacir,
coorient. III. Título.

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

Ana Cristina Roginski

**METABÓLITOS ACUMULADOS NA ACIDEMIA PROPIÔNICA
COMPROMETEM A BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E A
HOMEOSTASE DO CÁLCIO EM CORAÇÃO E RINS DE RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Umpierrez Amaral

Coorientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Porto Alegre

2022

“Para meus pais, Vera e Valmor, e
minha avó Maria Salete. E a todos
aqueles que acreditam na ciência.”

AGRADECIMENTOS

Tenho consciência de que jamais chegaria até aqui sozinha. Sei também que corro o risco de cometer a injustiça de não citar todos os nomes que deveriam ser citados aqui. Entretanto, não posso deixar de agradecer, em especial:

Aos meus orientadores Prof. Dr. Alexandre Umpierrez Amaral, por acreditar em mim e no meu trabalho desde 2014, pelos ensinamentos durante todos esses anos e pela oportunidade de trilhar um dos meus sonhos. Ao Prof. Dr. Moacir Wajner, por me receber em seu laboratório e pelos seus ensinamentos.

A Cris, “mitoamiga” que me ensinou muito do que hoje sei, e que mesmo do outro lado do mundo sempre me socorreu e continuou me ensinando. Ao Rafa, que me acolheu desde minha primeira visita ao lab. Obrigada pelas risadas, experimentos, devaneios e por todos os momentos que eu trago no coração. A Bianca, que és um exemplo para mim com sua sensatez, responsabilidade e uma leveza que é só dela. A Morgana, que chegou de mansinho, se tornou uma grande amiga e mesmo sem saber me fez crescer com as nossas conversas. A Camila, pela amizade e os experimentos desafiadores. E ao Marschner, pelo teu alto astral, pelas conversas e por todas as vezes que te fiz trabalhar no final de semana, valeu mesmo.

Ao Prof. Dr. Guilhian, que por vezes me ouviu e sempre com uma palavra de sabedoria me incentivou a nunca desistir, e a batalhar pelos meus sonhos. Aos alunos do Guilhian por pela convivência diária, pela dúvida tirada ou pela risada dada, em especial a Bel e o Mateus, duas pessoas que admiro tanto e que espero esbarrar em vocês por esse mundo ainda.

Aos meus pais Valmor e Vera, pelo amor, confiança e apoio incondicionais. Por entenderem que para realizar meus sonhos, eu precisei trilhar um caminho distante. Por nunca terem medido esforços pela minha criação, educação e para que hoje eu estivesse aqui conquistando um sonho, que seria impossível sem vocês. Eu amo vocês!

A minha vó, Dona Salete que sempre me cuidou como se fosse filha, e sempre torceu por mim. Aos meus tios Pablo e Cláudio, que me receberam de braços abertos no começo dessa caminhada, e sempre estiveram ali para aquela conversa despreocupada no final da tarde, ou no almoço de domingo que aquece o coração de quem está longe de casa. Também a toda a minha família, que sempre vibraram com as minhas conquistas e deixaram claro seu orgulho por mim.

A Ana, Iohana, Estela, Tati que desde a faculdade são minhas grandes amigas e que mesmo quando a distância se fez presente, nunca estiveram longe.

A Giovanna, ao Igor, a Fabi e ao Eduardo. Pelas risadas, conversas, amizade, e por todas as idas ao cachorrodromo. Com vocês construí boas lembranças, em um momento tão difícil, como essa pandemia.

Finalmente, ao Marcelo. Pelo teu amor, companheirismo, incentivo e por ser inspiração. Por acreditar mais em mim, do que eu mesma. Por ser a calma depois da tempestade, mas também por ser o vendaval que muda tudo de lugar. *“Parce que c’etait lui. Parce que c’etait moi”*.

EPÍGRAFE

“Não é o que acontece com
você, mas como você reage a
isso que importa.”

- Epicteto.

RESUMO

A acidemia propiônica é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência na atividade da enzima mitocondrial propionil-CoA-carboxilase (PCC). A doença é bioquimicamente caracterizada por predominante acúmulo de ácido propiônico (PA) no plasma e clinicamente por severa encefalopatia, além de cardiomiopatia e doença renal crônica. Alta excreção urinária dos ácidos 3-hidroxi propiônico (3OHPA), 2-metilcítrico (2MCA) e maleico (MA) também é reportada nos pacientes. Considerando que os mecanismos patogênicos das alterações cardíacas e renais são praticamente desconhecidos nessa doença, a presente tese investigou os efeitos do PA, 3OHPA, MA e 2MCA (0,05 – 5 mM) sobre críticos parâmetros da homeostase mitocondrial bioenergética e do Ca^{2+} em preparações mitocondriais e homogeneizados obtidos de coração e rim de ratos *Wistar* jovens (30 dias de vida), bem como em cultura de células cardíacas (H9c2) e renais (HEK-293). Foram determinados os parâmetros respiratórios estado 3 (estimulado por ADP), estado 4 (estimulado por oligomicina), estado desacoplado (estimulado por CCCP) e razão do controle respiratório (RCR), o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), o conteúdo de NAD(P)H, a capacidade de retenção de Ca^{2+} e o inchamento mitocondrial. Além disso, foram avaliados a produção de ATP, a atividade de enzimas do ciclo do ácido cítrico e dos complexos da cadeia respiratória. A viabilidade celular também foi investigada após 24 horas de pré-incubação com o PA e MA. Observou-se que o MA inibiu os estados 3, 4 e desacoplado em preparações mitocondriais de coração e rim utilizando principalmente substratos precursores de NADH (glutamato mais malato, piruvato mais malato, glutamato ou α -cetogluturato) em comparação ao FADH_2 (succinato), que foram associados a uma diminuição na produção de ATP. Por outro lado, o PA e o 3OHPA provocaram efeitos inibitórios sobre a respiração mitocondrial mais moderados, enquanto o 2MCA não causou alterações. Os efeitos marcantes causados pelo MA podem estar em parte relacionados à inibição da α -cetogluturato desidrogenase e glutamato desidrogenase, além de depleção de CoA pois a inibição da respiração mitocondrial causada pelo MA foi parcialmente revertida por suplementação dessa coenzima. Resultados similares foram obtidos em homogeneizados e cultura de células permeabilizadas desses tecidos, corroborando os achados obtidos em mitocôndrias isoladas. Somando-se a isso, o MA, e o PA em menor extensão, reduziram o $\Delta\Psi_m$, o conteúdo de NAD(P)H e a capacidade de retenção de Ca^{2+} , bem como induziram inchamento em preparações mitocondriais de coração e rim na presença de Ca^{2+} . Esses efeitos foram parcial ou totalmente prevenidos por ciclosporina A e ADP, sugerindo que a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial possa estar envolvido. Finalmente, o MA reduziu a viabilidade e induziu morte em células renais. Analisando em conjunto, os resultados indicam que o MA, além do PA e 3OHPA de forma mais branda, atuam como inibidores metabólicos, bem como o MA e o PA induzem a abertura PTP, em coração e rins, comprometendo dessa forma a homeostase mitocondrial bioenergética e do Ca^{2+} . Portanto, presume-se que uma disfunção mitocondrial causada pelos metabólitos acumulados na acidemia propiônica possa contribuir para a cardiomiopatia e insuficiência renal crônica que se manifestam nos pacientes acometidos por essa doença.

ABSTRACT

Propionic acidemia is an inborn error of metabolism caused by a deficiency in the mitochondrial enzyme propionyl-CoA-carboxylase (PCC) activity. The disease is biochemically characterized by predominant propionic acid (PA) accumulation in plasma and clinically by severe encephalopathy, besides cardiomyopathy and chronic kidney disease. High urinary excretion of 3-hydroxypropionic (3OHPA), 2-methylcitric (2MCA), and maleic (MA) acids is also reported in patients. The pathogenic mechanisms of cardiac and renal alterations are practically unknown in this disease, the present thesis investigated the effects of PA, 3OHPA, MA, and 2MCA (0.05 – 5 mM) on critical parameters of mitochondrial bioenergetics and Ca^{2+} homeostasis in isolated mitochondria and homogenates obtained from heart and kidney of young Wistar rats (30 days old), as well as from cardiac (H9c2) and renal (HEK-293) cell cultures. The respiratory parameters state 3 (ADP-stimulated), state 4 (oligomycin-stimulated), uncoupled state (CCCP-stimulated) and respiratory control ratio (RCR), membrane potential ($\Delta\Psi_m$), NAD(P)H content, Ca^{2+} retention capacity, and mitochondrial swelling were determined. In addition, ATP production, citric acid cycle enzymes, and respiratory chain complexes activities were evaluated. Cellular viability was also investigated after 24 hours of pre-incubation with PA and MA. It was observed that MA inhibited states 3, 4 and uncoupled respiration in heart and kidney mitochondria using primarily NADH-linked substrates (glutamate plus malate, pyruvate plus malate, glutamate or α -ketoglutarate) as compared to FADH_2 (succinate), which were associated with a decrease in ATP production. PA and 3OHPA caused milder inhibitory effects on mitochondrial respiration, and 2MCA did not cause any changes. The marked effects caused by MA may be related to the inhibition of α -ketoglutarate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase, and CoA depletion since the inhibition of mitochondrial respiration caused by MA was partially reversed by supplementation of this coenzyme. Similar results were obtained in tissue homogenates and permeabilized cell cultures, corroborating the findings obtained in isolated mitochondria. In addition, MA, and PA, to a lesser extent, reduced the $\Delta\Psi_m$, NAD(P)H content, Ca^{2+} retention capacity, and induced swelling in Ca^{2+} -loaded heart and kidney mitochondrial preparations. These effects were partial or totally prevented by cyclosporine A and ADP, suggesting mitochondrial permeability transition (MPT) pore opening may be involved. Finally, MA reduced viability and induced kidney cells death. Taken together, the data indicate that MA, and PA and 3OHPA, to a lesser degree, acts as metabolic inhibitors, as well as MA and PA induce MPT in the heart and kidney, thus compromising mitochondrial energy and Ca^{2+} homeostasis. Therefore, it is presumed that mitochondrial dysfunction caused by the metabolites accumulated in propionic acidemia may contribute to the cardiomyopathy and chronic renal failure that manifest in patients affected by this disease.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2MCA - Ácido 2-metilcítrico
3OHPA - Ácido 3-hidroxiopropiônico
ACO – Aconitase
ANT – Transportador de nucleotídeos de adenina
AOs - Acidemias orgânicas
AP - Acidemia propiônica
CAC - Ciclo do ácido cítrico
CK – Creatina cinase
CsA – Ciclosporina A
CTE - Cadeia transportadora de elétrons
Cyp D - Ciclofilina D
EIM - Erros do metabolismo
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas
GDH – Glutamato desidrogenase
IDH - Isocitrato desidrogenase
KGDH - α -Cetoglutarato desidrogenase
MA - Ácido maleico
MCU – Transportador uniporte de Ca^{2+} mitocondrial
MDH – Malato desidrogenase
MS/MS – Espectroscopia de massas tandem
OXPHOS - Fosforilação oxidativa
PA - Ácido propiônico
PCC - Propionil-CoA-carboxilase
PDH - Piruvato desidrogenase
PI – Iodeto de propídio
PTP - Poro de transição de permeabilidade
SDH – Succinato desidrogenase
SF - Síndrome de Fanconi
VDAC – Canais de ânions dependentes de voltagem
 $\Delta\Psi_m$ – Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

PARTE I: INTODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO.....	1
1.1.1. Classificação dos erros inatos do metabolismo.....	3
1.2. ACIDEMIAS ORGÂNICAS.....	4
1.3. ACIDEMIA PROPIÔNICA.....	5
1.3.1. Sintomatologia.....	8
1.3.2. Diagnóstico.....	9
1.3.3. Tratamento.....	10
1.3.4. Fisiopatologia	11
1.4.MITOCÔNDRIA, CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO, FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA E HOMEOSTASE MITOCONDRIAL DO Ca ²⁺	15
1.5. METABOLISMO ENERGÉTICO CARDÍACO E RENAL.....	21
2. OBJETIVO GERAL	24
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24

PARTE II: ARTIGOS CIENTÍFICOS

CAPÍTULO I.....	26
CAPÍTULO II.....	39
CAPÍTULO III.....	54

PARTE III: DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

3. DISCUSSÃO.....	79
4. CONCLUSÕES	90
5. PERSPECTIVAS.....	91
6. REFERÊNCIAS.....	92
7. ANEXOS.....	108
7.1. CARTA DE APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	108
7.2.LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	109
7.3. LISTA DE TABELAS	110

PARTE I: Introdução e Objetivos

1. INTRODUÇÃO

1.1. ERROS INATOS DO METABOLISMO

O termo Erros Inatos do Metabolismo (EIM) foi utilizado pela primeira vez em 1908 pelo médico inglês Sir. Archibald E. Garrod, para descrever as doenças genéticas alcaptonúria, albismo, pentosúria e cistinúria, e que atualmente compreende um grupo de ao menos 750 doenças metabólicas (EZGU, 2016; FERREIRA; VAN KARNEBEEK, 2019).

Os EIM apresentam característica de herança Mendeliana, sendo causados por mutações em um único gene (LANPHER; BRUNETTI-PIERRI; LEE, 2006). O perfil de mutações é diverso, podendo ser observadas mutações de ponto, inserções, deleções ou rearranjo cromossômico que acarretem ganho ou perda de função enzimática ou de transporte. Geralmente exibem herança autossômica recessiva, entretanto EIM com perfil genético autossômico dominante ou ligado ao cromossomo X já foram identificados (EZGU, 2016; FERREIRA; VAN KARNEBEEK, 2019; LANPHER; BRUNETTI-PIERRI; LEE, 2006; LEONARD; MORRIS, 2000).

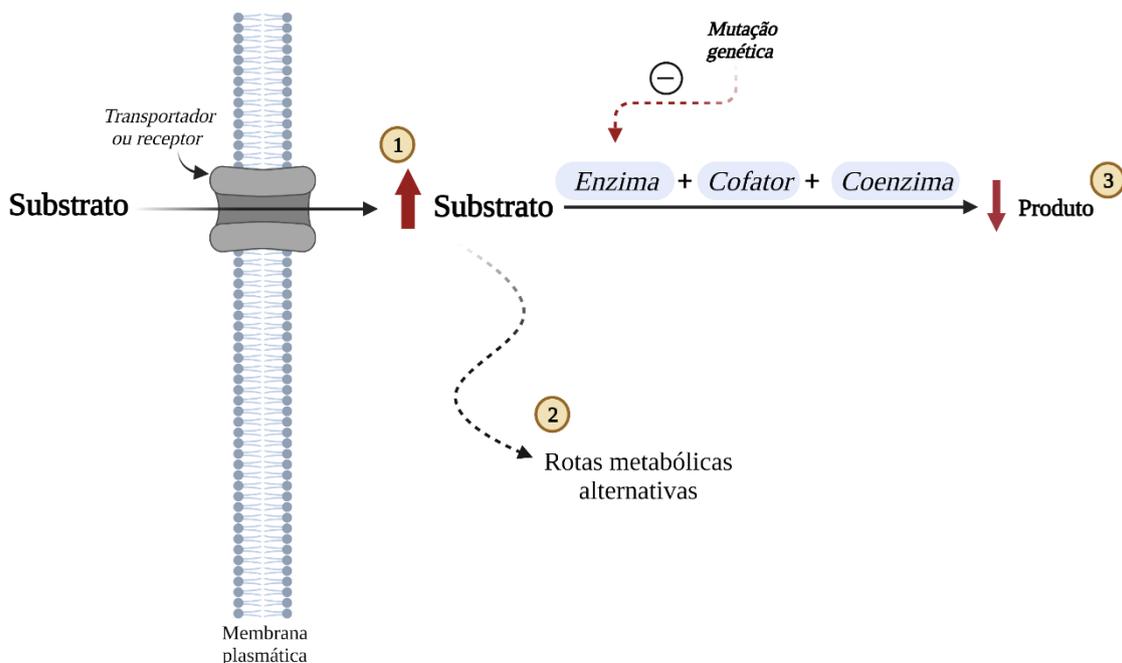
O bloqueio enzimático numa rota metabólica desencadeado pela alteração genética está frequentemente associado a um dos três seguintes desfechos: 1) acúmulo de substratos nos passos anteriores ao bloqueio metabólico; 2) produção de intermediários oriundos de rotas metabólicas alternativas utilizadas na tentativa de contornar o bloqueio; 3) prejuízos na produção de energia decorrentes da deficiência de produtos posteriores ao bloqueio metabólico (EZGU, 2016; FERREIRA; VAN KARNEBEEK, 2019; SAUDUBRAY; SEDEL; WALTER, 2006), como ilustrado na **Figura 1**.

Embora façam parte do grupo de doenças raras, uma vez que individualmente possuem uma baixa incidência na população mundial, quando analisados coletivamente os EIM representam uma significativa proporção das desordens genéticas que acometem

a infância (EZGU, 2016; FERREIRA; VAN KARNEBEEK, 2019; RAGHUVEER; GARG; GRAF, 2006).

O avanço das tecnologias médicas, como a espectroscopia de massas tandem (MS/MS), aliado ao crescente conhecimento a respeito do genoma humano, cada vez mais auxiliam os corpos clínicos no diagnóstico precoce dos EIM (LINDNER; GRAMER; HAEGE; FANG-HOFFMANN *et al.*, 2011; RAGHUVEER; GARG; GRAF, 2006). Como exemplo disso, na Alemanha, após uma expansão e aprimoramento do programa de triagem neonatal, identificou-se incidência de EIM em 1:2920 nascidos vivos (LINDNER; GRAMER; HAEGE; FANG-HOFFMANN *et al.*, 2011). Enfatiza-se que a realização da triagem neonatal para identificar doenças genéticas, incluindo os EIM, é fundamental para iniciar o mais rapidamente possível as intervenções terapêuticas, se possível ainda no período pré-sintomático, reduzindo assim a mortalidade e morbidade dessas doenças (PREETI SHARMA, 2018).

Figura 1. Desfechos decorrentes da alteração genética subjacente aos EIM



Fonte: Adaptado de (EZGU, 2016). Criado com BioRender.com.

A frequência dos EIM sobe proporcionalmente em países ou regiões do mundo onde a taxa de casamentos consanguíneos é elevada (FERREIRA; VAN KARNEBEEK, 2019). Na Arábia Saudita, a incidência cumulativa de EIM, entre 1983 e 2008 foi de 1:667 nascidos vivos (MOAMMAR; CHERIYAN; MATHEW; AL-SANNAA, 2010). Em West Midlands, na Inglaterra, entre os anos de 1999 e 2003 a incidência foi de 1:703 nascidos vivos (SANDERSON; GREEN; PREECE; BURTON, 2006). Na British Columbia, Canadá, uma avaliação do período de 1969 a 1996 indicou uma prevalência de 1:2500 nascidos vivos (APPLEGARTH; TOONE; LOWRY, 2000). Em Oman, estudos apontaram uma incidência de 1:784 nascidos vivos (JOSHI; HASHIM; VENUGOPALAN, 2002).

No Brasil, não existem dados oficiais quando a incidência ou prevalência dos EIM como um todo. Somente para algumas desordens isoladas, como a fenilcetonúria 1:22000 (ANVISA, 2020), doença da urina do xarope do bordo 1:100000 (HERBER; SCHWARTZ; NALIN; OLIVEIRA NETTO *et al.*, 2015) e a deficiência da biotinidase 1:250000 (PINTO; RAYMOND; BRUCK; ANTONIUK, 1998) nascidos vivos. No contexto nacional, destaca-se a homologação da lei nº 14.154, de 26 de maio de 2021, que aprimora o Programa Nacional de Triagem Neonatal por meio da ampliação escalonada do rol mínimo de desordens a serem rastreadas pelo “Teste do Pézinho” de 6 para até 50 desordens (BRASIL, 2021), o que deve aumentar o número de diagnósticos de EIM na população brasileira e possibilitar um tratamento mais adequado a esses pacientes.

1.1.1 Classificação dos erros inatos do metabolismo

Diversos sistemas de classificação para os EIM vêm sendo propostos nas últimas décadas. Alguns de acordo com o órgão/sistema comprometido (ex: neurológicas, hepáticas), outros com base nas organelas afetadas, (ex: mitocondriais, lisossomais), ou ainda levando em consideração a idade de aparecimento dos sintomas (ex: início neonatal

ou tardio). Entretanto, o modelo amplamente aceito é o proposto pela Sociedade para o Estudo de Erros Inatos do Metabolismo (*Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism* - SSIEM) (SSIEM, 2012), conforme resumido na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação dos EIM, segundo a SSIEM

Desordens do metabolismo de aminoácidos e peptídeos
Desordens do metabolismo de carboidratos
Desordens do metabolismo de ácidos graxos e corpos cetônicos
Desordens do metabolismo energético
Desordens do metabolismo de purinas, pirimidinas e nucleotídeos
Desordens do metabolismo de esteroides
Desordens do metabolismo de porfirinas e grupamento heme
Desordens do metabolismo de lipídeos e lipoproteínas
Desordens congênitas de glicosilação e outras desordens de modificação proteica
Desordens lisossomais
Desordens peroxissomais
Desordens do metabolismo de neurotransmissores
Desordens do metabolismo de vitaminas e cofatores (não proteicos)
Desordens do metabolismo de metais e elementos traços
Desordens e variantes do metabolismo de xenobióticos

1.2. ACIDEMIAS ORGÂNICAS

As acidemias orgânicas (AOs) são desordens do metabolismo intermediário causadas por uma deficiência enzimática que provoca o acúmulo anormal de ácidos carboxílicos nos líquidos corporais (EZGU, 2016; FERREIRA; VAN KARNEBEEK, 2019; PARK; KRYWAWYCH; RICHARD; DESVIAT *et al.*, 2020; REDDY; CALLONI; VERNON; BOLTSHAUSER *et al.*, 2018). Embora sejam classificadas como desordens do metabolismo de aminoácidos e peptídeos (SSIEM, 2012), a deficiência enzimática de algumas AOs pode igualmente comprometer o metabolismo de lipídeos e/ou carboidratos (IMPERLINI; SANTORELLI; ORRU; SCOLAMIERO *et al.*, 2016; WAJNER; GOODMAN, 2011). Destaca-se que o surgimento dos sinais e a severidade dos sintomas estão associados a atividade residual enzimática observada em cada paciente (EZGU, 2016; FERREIRA; VAN KARNEBEEK, 2019; IMPERLINI; SANTORELLI; ORRU;

SCOLAMIERO *et al.*, 2016; PARK; KRYWAWYCH; RICHARD; DESVIAT *et al.*, 2020; REDDY; CALLONI; VERNON; BOLTSHAUSER *et al.*, 2018; WAJNER, 2019).

Durante o período neonatal, as AOs com maior incidência de diagnósticos são aquelas envolvidas no catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada, como a acidemia metilmalônica, acidemia isovalérica, acidemia glutárica do tipo 1, e a acidemia propiônica, objeto de estudo deste trabalho (CHAPMAN, 2019; SAUDUBRAY; GARCIA-CAZORLA, 2018).

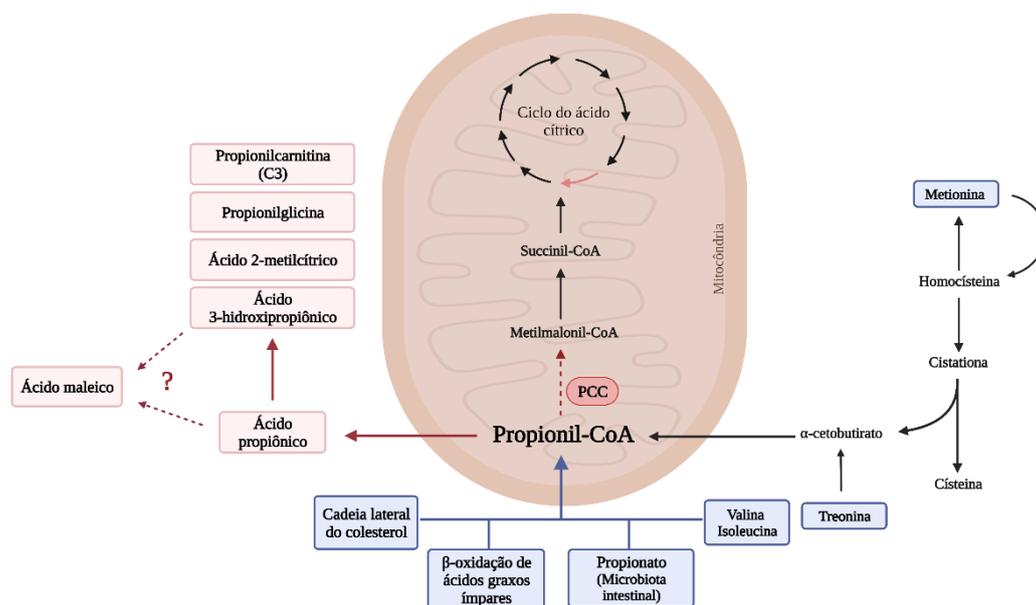
1.3. ACIDEMIA PROPIÔNICA

Descrita inicialmente em 1961, a acidemia propiônica (AP) (OMIM ID:606054) é uma das mais frequentes acidemias orgânicas com elevada mortalidade. Estima-se que a incidência da AP seja em torno 1:100.000 – 150.000 recém-nascidos vivos na Europa (JURECKI; UEDA; FRAZIER; ROHR *et al.*, 2019; WAJNER, 2019) e 1:242.741 nos Estados Unidos da América (JURECKI; UEDA; FRAZIER; ROHR *et al.*, 2019). Contudo, em regiões com altas taxas de casamentos consanguíneos, a incidência da AP é maior, como no Kuwait (1:59426 nascidos vivos) (CHAPMAN; GRAMER; VIALI; SUMMAR, 2018), e na população Inuit, na Groelândia (1:1000 nascidos vivos) (ZAYED, 2015). Nos países árabes, como na Arábia Saudita (1:27264 nascidos vivos), e algumas tribos Saudi (1:2000 – 1:5000 nascidos vivos) a prevalência da AP é ainda mais elevada (ZAYED, 2015).

A AP é caracterizada bioquimicamente pela deficiência na atividade da enzima mitocondrial propionil-CoA carboxilase (PCC) (EC. 6.4.13) devido a mutações nos genes *PCCA* ou *PCCB*, os quais são responsáveis pela codificação das subunidades que a compõem (PENA; FRANKS; CHAPMAN; GROPMAN *et al.*, 2012; SHCHELOCHKOV, 2012). A PCC é um heterododecâmero de 750 kDa composto por 6

subunidades α e 6 subunidades β , dependente de biotina (WONGKITTICHOTE; AH MEW; CHAPMAN, 2017). Essa enzima catalisa a carboxilação do propionil-CoA a D-metilmalonil-CoA, posteriormente convertido em succinil-CoA e oxidado no ciclo do ácido cítrico (CAC) para produção de ATP (CHAPMAN; SUMMAR, 2012; DE KEYZER; VALAYANNOPOULOS; BENOIST; BATTEUX *et al.*, 2009; JURECKI; UEDA; FRAZIER; ROHR *et al.*, 2019; LONGO; PRICE; GAPPMAIER; CANTOR *et al.*, 2017; SHCHELOCHKOV, 2012) (**Figura 2**).

Figura 2. Metabolismo do propionil-CoA



Fonte: Adaptado de (TAJIMA; KAGAWA; SAKURA; NAKAMURA-UTSUNOMIYA *et al.*, 2021).

Criado com BioRender.com.

O propionil-CoA é um metabólito comum às rotas de catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (isoleucina, valina, metionina e treonina), dos ácidos graxos de cadeia ímpar, e da cadeia lateral do colesterol (HAIJES; JANS; VAN DER HAM; VAN HASSELT *et al.*, 2020; JURECKI; UEDA; FRAZIER; ROHR *et al.*, 2019; LONGO; PRICE; GAPPMAIER; CANTOR *et al.*, 2017; PARK; KRYWAWYCH; RICHARD; DESVIAT *et al.*, 2020). O metabolismo dos nucleotídeos timina e uracila, bem como o

metabolismo da microbiota residente no intestino também contribuem para uma substancial fonte de propionato, que após metabolismo mitocondrial dá origem ao propionil-CoA (FENTON.; GRAVEL.; ROSENBLATT, 2001; LONGO; PRICE; GAPPMAIER; CANTOR *et al.*, 2017) (**Figura 2**). Estima-se que 50 % da produção de propionato seja devido ao catabolismo dos aminoácidos, 25 % produzido pelo catabolismo dos ácidos graxos de cadeia ímpar e 25 % oriundo do metabolismo bacteriano (FENTON.; GRAVEL.; ROSENBLATT, 2001). O principal órgão responsável pela metabolização do propionato é o tecido hepático (WILSON; HAN; ZHANG; HESS *et al.*, 2017).

A deficiência enzimática da PCC provoca o acúmulo de propionil-CoA, o qual é convertido espontaneamente a ácido propiônico (PA) por reação de hidrólise (FENTON.; GRAVEL.; ROSENBLATT, 2001), cujas concentrações podem alcançar 4-6 mM no plasma dos pacientes. Os níveis de PA plasmáticos em indivíduos não portadores de AP, são cerca de 4 μ M (HOMMES; KUIPERS; ELEMA; JANSEN *et al.*, 1968; WANG; CHRISTOPHER; WILSON; MUOIO *et al.*, 2018). Conjuntamente, observa-se aumento plasmático nos níveis de propionilcarnitina e glicina (FENTON.; GRAVEL.; ROSENBLATT, 2001).

Análise da urina dos pacientes revela ainda alta excreção dos metabólitos ácido 3-hidroxi propiônico (3OHPA), subproduto da β -oxidação do PA (ANDO; RASMUSSEN; NYHAN; HULL, 1972; WONGKITTICHOTE; AH MEW; CHAPMAN, 2017), ácido 2-metilcítrico (2MCA) oriundo da conjugação do propionil-CoA e oxaloacetato em reação catalisada pela citrato sintase (WEIDMAN; DRYSDALE, 1979), propionilglicina e tiglicina, e ausência de ácido metilmalônico (FENTON.; GRAVEL.; ROSENBLATT, 2001; PARK; KRYWAWYCH; RICHARD; DESVIAT *et al.*, 2020; WAJNER, 2019; WONGKITTICHOTE; AH MEW; CHAPMAN, 2017). Já foi descrito

também aumento na excreção urinária de ácido maleico (MA) (BERGSTROM; GRETER; LEVIN; STEEN *et al.*, 1981), possivelmente decorrente do metabolismo hepático do PA e 3OHPA (WILSON; HAN; ZHANG; HESS *et al.*, 2017).

1.3.1. Sintomatologia

A AP apresenta espectro fenotípico bastante amplo. O início dos sinais e sintomas podem ser verificados na fase neonatal ou no chamado início tardio da doença, quando os sinais e sintomas aparecem na infância ou na vida adulta (FENTON.; GRAVEL.; ROSENBLATT, 2001; SHCHELOCHKOV, 2012; WONGKITTICHOTE; AH MEW; CHAPMAN, 2017).

Na forma neonatal da doença, fenótipo com maior incidência, o recém-nascido apresenta recusa alimentar e apatia horas, dias ou semanas após o nascimento, que pode ser seguida por progressiva encefalopatia (JURECKI; UEDA; FRAZIER; ROHR *et al.*, 2019; SHCHELOCHKOV, 2012; WAJNER, 2019). Na ausência de diagnóstico e tratamento apropriados, o quadro clínico pode evoluir para letargia, convulsões e coma. Sendo frequentemente acompanhado por acidose metabólica, acidose láctica, cetonúria, hipoglicemia, hiperamonemia e pancitopenia. Nos casos mais graves, o paciente pode evoluir ao óbito (JURECKI; UEDA; FRAZIER; ROHR *et al.*, 2019; LONGO; PRICE; GAPPMAIER; CANTOR *et al.*, 2017; PENA; FRANKS; CHAPMAN; GROPMAN *et al.*, 2012; SHCHELOCHKOV, 2012; WAJNER, 2019).

Os pacientes com a forma tardia da AP geralmente apresentam fenótipos menos graves da doença. Os sinais e sintomas apresentados por esses pacientes incluem atraso no desenvolvimento, desabilidade mental e intelectual, deficiência de crescimento, queixas gastrointestinais crônicas, pancreatite, intolerância a proteínas, psicose, hipotonia, distonia, coreoatetose e cardiomiopatia, sendo esta última a complicação mais

associada a risco de morte nesses pacientes (GRUNERT; MULLERLEILE; DE SILVA; BARTH *et al.*, 2013; PENA; BURTON, 2012; WAJNER, 2019; WONGKITTICHOTE; AH MEW; CHAPMAN, 2017). Manifestações menos comuns como atrofia ótica, perda da audição, e doença renal crônica, também já foram relatados em pacientes com AP (JURECKI; UEDA; FRAZIER; ROHR *et al.*, 2019; SHCHELOCHKOV, 2012).

A sintomatologia clínica dos pacientes é agravada severamente durante episódios de descompensação metabólica aguda caracterizados por elevado catabolismo, tais como quadros infecciosos, cirurgia e jejum prolongado, desencadeando um aumento drástico nas concentrações dos metabólitos acumulados na AP. Dessa forma, situações de descompensação metabólica devem ser evitadas ao máximo (FRASER; VENDITTI, 2016; SAUDUBRAY; GARCIA-CAZORLA, 2018; SHCHELOCHKOV, 2012).

1.3.2. Diagnóstico

A detecção da AP no período neonatal é realizada por espectrometria de massas tandem (MS/MS) através da análise do perfil de acilcarnitinas e aminoácidos plasmáticos em amostras de sangue seco colhidas em papel filtro (teste do pezinho). Usualmente se encontram aumentados o perfil de propionilcarnitina (C3) e marcadores secundários como a razão de C3/C2 e C3/C13 de acilcarnitinas, bem como a concentração plasmática de glicina. A avaliação do perfil específico de ácidos orgânicos urinários da AP (3OHPA, 2MCA, propionilglicina e tigliglicina) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é um método que auxilia no diagnóstico da AP (JURECKI; UEDA; FRAZIER; ROHR *et al.*, 2019; SHCHELOCHKOV, 2012; VIDAILHET, 2016).

Durante os períodos de descompensação metabólica aguda, observa-se ainda elevação de lactato sérico, hipoglicemia, hiperamonemia, e altas concentrações de corpos cetônicos urinários e plasmáticos (SHCHELOCHKOV, 2012).

Por fim, a confirmação do diagnóstico de AP pode ser realizada pela detecção de mutações patogênicas nos genes *PCCA* ou *PCCB*, e/ou por prova confirmatória de deficiência enzimática da PCC em linfócitos ou cultura de fibroblastos dos pacientes (JURECKI; UEDA; FRAZIER; ROHR *et al.*, 2019; PENA; FRANKS; CHAPMAN; GROPMAN *et al.*, 2012; SHCHELOCHKOV, 2012).

Enfatiza-se que o diagnóstico através da triagem neonatal é essencial para o início do tratamento ainda no período pré-sintomático, o que promove uma melhora significativa no prognóstico dos pacientes.

1.3.3. Tratamento

As estratégias terapêuticas mais utilizadas no manejo destes pacientes consistem em reduzir a produção tecidual dos metabólitos potencialmente tóxicos, através de dietas com restrição proteica e prevenção de crises catabólicas. Neste particular, o uso de fórmulas alimentares especificamente desenvolvidas para estes pacientes, na intenção de controlar a ingestão de substratos propiogênicos, como os aminoácidos isoleucina, valina, metionina e treonina, adequadas a cada faixa etária, permite o gerenciamento das práticas alimentares que asseguram estabilidade metabólica, adequado crescimento, prevenção do catabolismo proteico, deficiência de aminoácidos, e obesidade (FRASER; VENDITTI, 2016; SHCHELOCHKOV, 2012). Ainda, evitar episódios de jejum prolongado, infecções, febre, traumas, ou qualquer outro evento que predisponha uma aceleração do catabolismo com intensa lipólise e proteólise muscular, é igualmente importante.

Além disso, pacientes com AP podem requerer suplementação com levocarnitina, visando prevenir sua deficiência secundária (FRASER; VENDITTI, 2016), bem como podem ser necessário o tratamento com antibióticos, como metronidazol, para redução das concentrações de PA entérico. Em casos de recorrente hiperamonemia, benzoato de sódio ou fenilbutirato de sódio podem ser prescritos (FRASER; VENDITTI, 2016).

Em casos de recorrente descompensação metabólica, apesar das intervenções terapêuticas, pode ser indicado o transplante hepático (BARSHES; VANATTA; PATEL; CARTER *et al.*, 2006; DAVISON; DAVIES; WILSON; SUN *et al.*, 2011; QUINTERO; MOLERA; JUAMPEREZ; REDECILLAS *et al.*, 2018). Porém, o custo-benefício dessa intervenção deve ser avaliada caso a caso, uma vez que os transplantes não asseguram uma estabilização das crises metabólicas, nem prevenção da progressão de complicações (BERRY; BLUME; WESSEL; SINGH *et al.*, 2020; VARA; TURNER; MUNDY; HEATON *et al.*, 2011).

1.3.4. Fisiopatologia

Embora as evidências científicas obtidas nos últimos anos, somadas a recorrente observação do fato dos pacientes apresentarem fenótipo clínico inicial saudável, sustentarem a hipótese de que os metabólitos acumulados na AP prejudicam importantes funções celulares e, dessa forma, contribuam significativamente para a patogênese do dano tecidual na AP (FRASER; VENDITTI, 2016; LONGO; PRICE; GAPPMAIER; CANTOR *et al.*, 2017; LUCKE; PEREZ-CERDA; BAUMGARTNER; FOWLER *et al.*, 2004; MORLAND; FROLAND; PETTERSEN; STORM-MATHISEN *et al.*, 2018; RAGHUVVEER; GARG; GRAF, 2006; SAUDUBRAY; MOCHEL; LAMARI; GARCIA-CAZORLA, 2019; WONGKITTICHOTE; AH MEW; CHAPMAN, 2017), os mecanismos bioquímicos pelos quais eles exercem sua toxicidade ainda precisa ser melhor elucidado.

Neste contexto, tem-se pesquisado nos últimos anos principalmente os efeitos neurotóxicos *in vitro* e *in vivo* dos PA e 2MCA. Evidências experimentais demonstraram que esses ácidos orgânicos prejudicam o metabolismo energético (AMARAL; CECATTO; CASTILHO; WAJNER, 2016), dos ácidos graxos (THOMAS; FOLEY; MEPHAM; TICHENOFF *et al.*, 2010) e da amônia (CUDRE-CUNG; ZAVADAKOVA; DO VALE-PEREIRA; REMACLE *et al.*, 2016; JAFARI; BRAISSANT; ZAVADAKOVA; HENRY *et al.*, 2013), induzem estresse oxidativo (FONTELLA; PULROLNIK; GASSEN; WANNMACHER *et al.*, 2000; MIRZA; SHARMA, 2019; NGUYEN; MORLAND; GONZALEZ; RISE *et al.*, 2007; PETTENUZZO; SCHUCK; FONTELLA; WANNMACHER *et al.*, 2002; RIGO; PASQUETTI; MALFATTI; FIGHERA *et al.*, 2006) e excitotoxicidade glutamatérgica (BRUSQUE; ROTTA; TAVARES; EMANUELLI *et al.*, 2001; EL-ANSARY; AL-SALEM; ASMA; AL-DBASS, 2017), bem como inibem a bomba Na⁺, K⁺-ATPase (WYSE; BRUSQUE; SILVA; STRECK *et al.*, 1998). Além disso, alterações neuronais e/ou gliais tem sido descritas, tais como astrogliose, ativação microglial, indução de apoptose glial, ativação da via da caspase-3 e redução dos espinhos dendríticos (CHOI; KIM; MUN, 2020; DE ALMEIDA; FUNCHAL; GOTTFRIED; WAJNER *et al.*, 2006; JAFARI; BRAISSANT; ZAVADAKOVA; HENRY *et al.*, 2013; LOBZHANIDZE; JAPARIDZE; LORDKIPANIDZE; RZAYEV *et al.*, 2020; MACFABE; CAIN; BOON; OSSENKOPP *et al.*, 2011).

Em tecidos periféricos, como o hepático, foi identificado que o propionil-CoA, PA e 2MCA prejudicam o metabolismo energético por inibirem a atividade de importantes enzimas, como a α -cetoglutarato desidrogenase (KGDH) (SCHWAB; SAUER; OKUN; NIJTMANS *et al.*, 2006), piruvato desidrogenase (PDH) (GREGERSEN, 1981; PATEL; DEBUYSERE; OLSON, 1983; SCHWAB; SAUER; OKUN; NIJTMANS *et al.*, 2006),

succinil-CoA-sintetase (STUMPF; MCAFEE; PARKS; EGUREN, 1980), citrato sintase, isocitrato desidrogenase (IDH) e aconitase (ACO) (CHEEMA-DHADLI; LEZNOFF; HALPERIN, 1975). Já no tecido cardíaco, o acúmulo de PA, propionilcarnitina e 2MCA, perturbam o funcionamento do canal de potássio do tipo KCNH2, provocando prolongamento da onda QT devido a um retardado na repolarização, fenômeno semelhante ao observado nos pacientes (BODI; GRUNERT; BECKER; STOELZLE-FEIX *et al.*, 2016). O propionil-CoA também inibe enzimas envolvidas no metabolismo da amônia, como a carbamoil-fosfato sintetase 1 (MARTIN-REQUERO; CORKEY; CERDAN; WALAJTYS-RODE *et al.*, 1983) e N-acetilglutamato sintase (COUDE; SWEETMAN; NYHAN, 1979).

No que diz respeito ao MA, estudos anteriores tem demonstrado a toxicidade renal desse composto, sendo inclusive utilizado como modelo para indução de tubulopatia proximal renal aguda semelhante a síndrome de DeToni-Debré-Fanconi, ou comumente denominada Síndrome de Fanconi (SF), em animais (BREWER; SENEKJIAN; INCE; WEINMAN, 1983; BRIONES-HERRERA; RAMIREZ-CAMACHO; ZAZUETA; TAPIA *et al.*, 2020; MAESAKA; MCCAFFERY, 1980; UWAI; NABEKURA, 2021). Esta síndrome caracteriza-se por acentuada excreção urinária de aminoácidos, glicose, fosfato, bicarbonato, e eletrólitos como sódio e potássio. A causa mais comum da SF em crianças são EIM, enquanto em adultos a SF se desenvolve devido a presença de toxinas endógenas ou exógenas (FOREMAN, 2019). No entanto, os fatores que precipitam a SF nessas situações ainda são desconhecidos.

Com relação aos mecanismos envolvidos na toxicidade renal exercida pelo MA, estudos em modelos animais demonstraram que esse ácido orgânico é capaz de inibir a atividade da bomba Na^+ , K^+ -ATPase (EIAM-ONG; SPOHN; KURTZMAN; SABATINI, 1995; MUJAIS, 1993), comprometer a bioenergética mitocondrial

(ANGIELSKI; ROGULSKI, 1962; BRIONES-HERRERA; RAMIREZ-CAMACHO; ZAZUETA; TAPIA *et al.*, 2020; SCHARER; YOSHIDA; VOYER; BERLOW *et al.*, 1972), o potencial de membrana (BRIONES-HERRERA; RAMIREZ-CAMACHO; ZAZUETA; TAPIA *et al.*, 2020), o metabolismo de ácidos graxos (ZAGER; JOHNSON; NAITO; BOMSZTYK, 2008), a função do retículo endoplasmático (MCLEESE; THIERY; BERGERON, 1996) e a homeostase do Ca^{2+} nos túbulos proximais (TUNCEL; RUPPERT; WANG; OKUN *et al.*, 2015; ZAGER; JOHNSON; NAITO; BOMSZTYK, 2008).

Além disso, alterações na função mitocondrial (GALLEGO-VILLAR; RIVERA-BARAHONA; CUEVAS-MARTIN; GUENZEL *et al.*, 2016) e no estado redox (GALLEGO-VILLAR; RIVERA-BARAHONA; CUEVAS-MARTIN; GUENZEL *et al.*, 2016; RIVERA-BARAHONA; ALONSO-BARROSO; PEREZ; MURPHY *et al.*, 2017) em diferentes tecidos, bem como uma perturbação da homeostase intracelular do Ca^{2+} em coração (TAMAYO; FULGENCIO-COVIAN; NAVARRO-GARCIA; VALBLASCO *et al.*, 2020), foram observadas no modelo genético da AP desenvolvido por Guenzel e colaboradores em camundongos (GUENZEL; HOFHERR; HILLESTAD; BARRY *et al.*, 2013). Ressalta-se ainda que alterações mitocondriais também já foram descritas em tecidos de pacientes com a AP (BARUTEAU; HARGREAVES; KRYWAWYCH; CHALASANI *et al.*, 2014; DE KEYZER; VALAYANNOPOULOS; BENOIST; BATTEUX *et al.*, 2009; MARDACH; VERITY; CEDERBAUM, 2005).

No entanto, apesar da intensa investigação, os mecanismos envolvidos na patogênese do dano tecidual na AP ainda permanecem sob intenso debate. Salienta-se que as pesquisas têm visado majoritariamente o entendimento da sintomatologia neurológica característica dos pacientes, sendo que ainda são insuficientes os trabalhos científicos que buscam a compreensão das lesões em tecidos periféricos que podem também acometer os

pacientes, como o cardíaco e o renal, especialmente o efeito dos metabólitos acumulados na AP sobre esses tecidos.

1.4. MITOCÔNDRIA, CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO, FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA E HOMEOSTASE MITOCONDRIAL DO Ca^{2+}

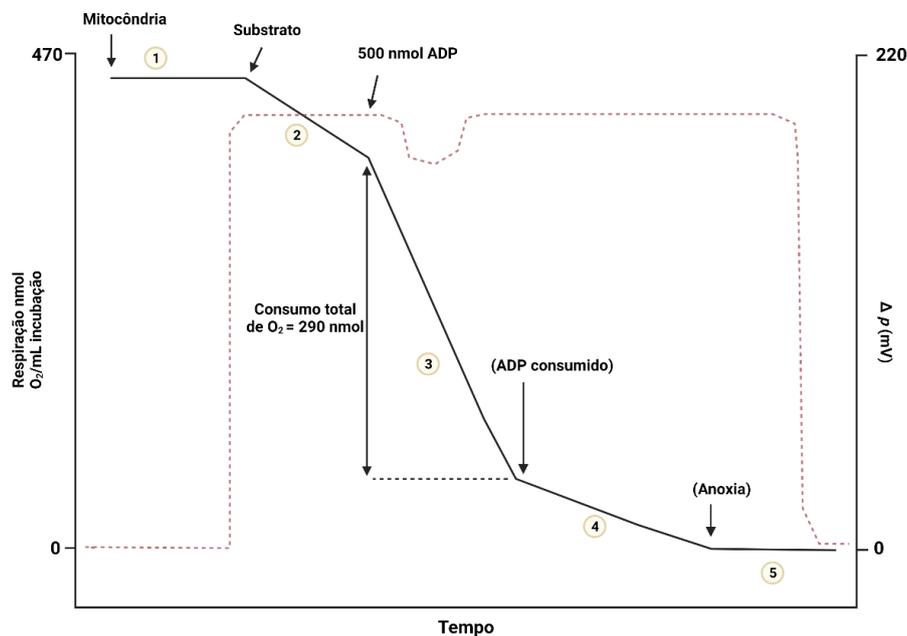
As mitocôndrias são organelas extremamente dinâmicas e as principais responsáveis pelo metabolismo energético celular. Além deste papel imprescindível, estão envolvidas em vários processos celulares, incluindo inflamação, homeostase redox e do cálcio, e morte celular (BOCK; TAIT, 2020; FAAS; DE VOS, 2020; JAVADOV; KOZLOV; CAMARA, 2020; NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; ONISHI; YAMANO; SATO; MATSUDA *et al.*, 2021; POPOV, 2020).

É na mitocôndria que está localizado o CAC, rota metabólica considerada o epicentro do metabolismo celular (NELSON, 2017). A oxidação de ácidos graxos, carboidratos, aminoácidos e do piruvato convergem para a formação de acetil-CoA majoritariamente, mas também podem originar outros intermediários do CAC. O acetil-CoA ao combinar-se com uma molécula de oxaloacetato, leva a formação de citrato, dando início ao CAC. Após 8 reações enzimáticas em cadeia, o ciclo se encerra com a produção de GTP, NADH e FADH_2 , além da reciclagem do oxaloacetato, podendo combinar-se com outra molécula de acetil-CoA para iniciar um novo ciclo, como ilustrado na **Figura 3** (NELSON, 2017).

As coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 produzidas pelo CAC alimentam a cadeia transportadora de elétrons (CTE), formada por um conjunto de proteínas (complexos enzimáticos I, II, III, IV e V, bem como o citocromo c) e uma coenzima lipossolúvel ancorada na membrana mitocondrial interna (NELSON, 2017) (**Figura 3**). NADH e FADH_2 fornecem elétrons para os complexos I e II, respectivamente, sendo estas as vias convencionais de entrada de elétrons. O fluxo de elétrons através dos complexos da CTE é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço

Experimentalmente, pode-se dividir a respiração mitocondrial em 5 estados (**Figura 4**), sendo os estados 3 e 4 comumente utilizados para avaliação da bioenergética mitocondrial. O estado 3 representa o consumo de O_2 quando as mitocôndrias são expostas a ADP exógeno (estado fosforilante), em um meio contendo substrato oxidável capaz de estimular o fornecimento de elétrons para a CTE. Já o estado 4, geralmente estimulado por oligomicina (inibidor da ATP sintase), reflete o consumo de O_2 necessário para a formação e manutenção do gradiente eletroquímico (estado não-fosforilante). Ainda, é possível utilizar compostos desacopladores da OXPHOS, que estimulam a atividade da CTE e o consumo de O_2 sem produção de ATP (estado desacoplado), induzindo a máxima capacidade respiratória da mitocôndria (GNAIGER, 2020; NICHOLLS; FERGUSON, 2013).

Figura 4. Estados da respiração mitocondrial



As mitocôndrias são inicialmente adicionadas a uma cuba contendo um eletrodo de oxigênio (estado 1). Após, adiciona-se substrato respiratório que causa um leve aumento na respiração pois o O_2 é consumido apenas para manutenção do gradiente de H^+ (estado 2). Posteriormente, adiciona-se ADP ao meio de incubação que contém fosfato inorgânico, proporcionando substratos para a síntese de ATP pela ATP sintase acoplada à reentrada de prótons e, dessa forma, promovendo um aumento significativo do consumo de O_2 (estado 3). Quando o ADP adicionado é depletado, a respiração novamente é reduzida (estado 4), até que finalmente o O_2 presente na cuba é completamente consumido, levando à anoxia (estado 5). A linha tracejada representa o potencial de membrana mitocondrial (Δp) em função do consumo de O_2 em cada estado respiratório, representado em mV.

Fonte: Adaptado (NICHOLLS; FERGUSON, 2013), criado com BioRender.com.

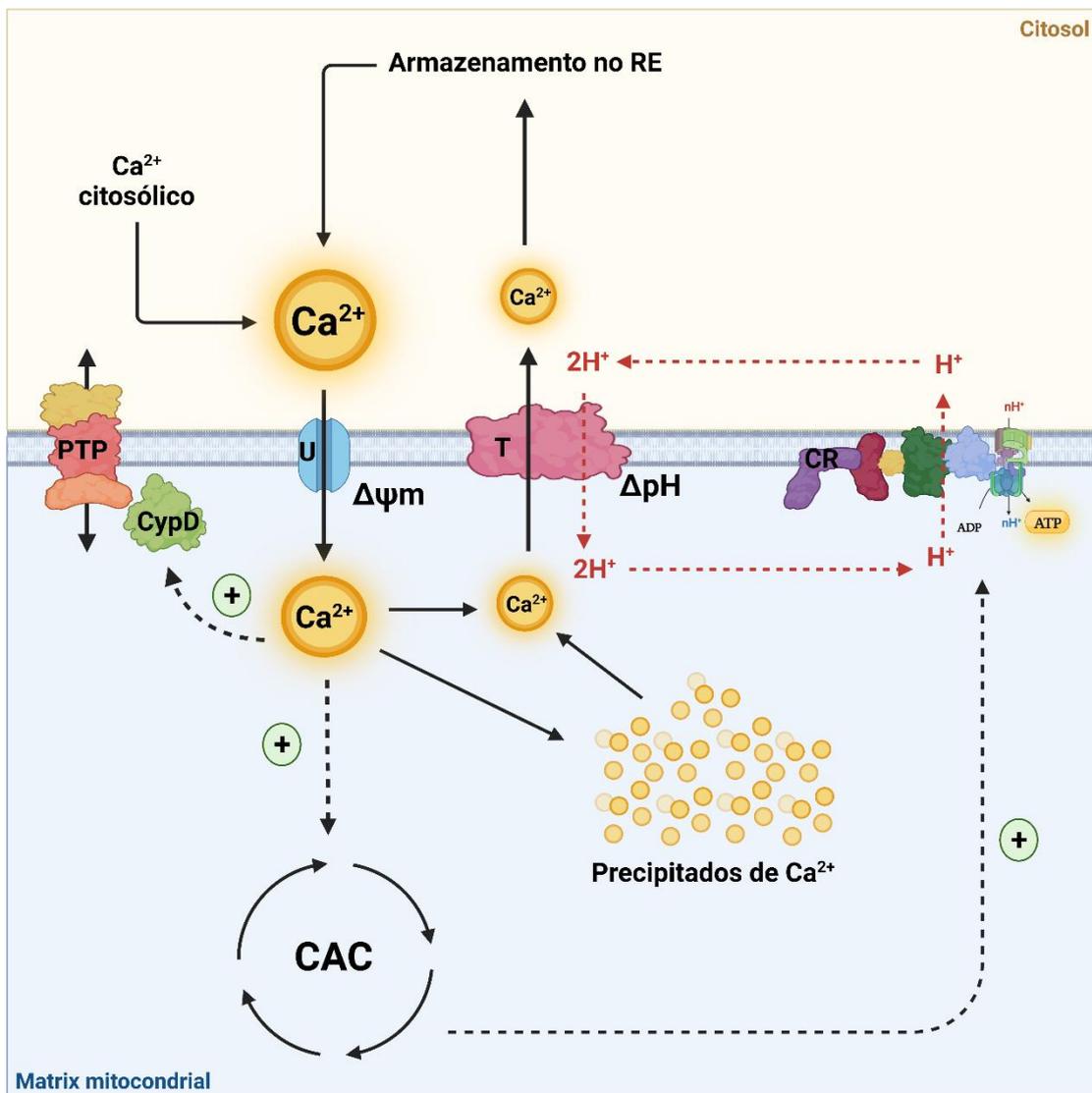
Somado a isso, ainda é possível avaliar diferentes aspectos da fisiologia mitocondrial, tais como o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), inchamento, capacidade de retenção de Ca^{2+} e o conteúdo de NAD(P)H mitocondrial, dentre outros parâmetros (MACIEL; KOWALTOWSKI; SCHWALM; RODRIGUES *et al.*, 2004; SAITO; CASTILHO, 2010).

A capacidade de retenção de Ca^{2+} pela mitocôndria é crucial para manutenção da homeostase celular deste íon, responsável por sinalizar e controlar uma série de eventos intracelulares. Essa organela quando íntegra e funcional é capaz de captar o Ca^{2+} presente no citosol em excesso e liberá-lo de seus estoques quando necessário para a função celular. Contribuindo assim, para a manutenção da concentração intracelular desse cátion em condições ótimas para o funcionamento celular (FIGUEIRA; BARROS; CAMARGO; CASTILHO *et al.*, 2013). O trânsito de Ca^{2+} mitocondrial tem sua captação através de um sistema uniporte (MCU) (BAUGHMAN; PEROCCHI; GIRGIS; PLOVANICH *et al.*, 2011; DE STEFANI; RAFFAELLO; TEARDO; SZABO *et al.*, 2011; PAN; LIU; NGUYEN; LIU *et al.*, 2013; PENDIN; GREOTTI; POZZAN, 2014), enquanto a liberação desse íon da matriz é realizada pelos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) e $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX) (BAUGHMAN; PEROCCHI; GIRGIS; PLOVANICH *et al.*, 2011; PAN; LIU; NGUYEN; LIU *et al.*, 2013; RIZZUTO; DE STEFANI; RAFFAELLO; MAMMUCARI, 2012), conforme demonstrado da **Figura 5**.

Quando em condições de sobrecarga citosólica de Ca^{2+} , que pode ser prejudicial ao funcionamento celular, a capacidade da mitocôndria de captar e reter este íon contribui para a manutenção da concentração citosólica de Ca^{2+} na faixa de $0,1 \mu\text{M}$ (RIZZUTO; DE STEFANI; RAFFAELLO; MAMMUCARI, 2012; VERCESI; CASTILHO; KOWALTOWSKI; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018). Por outro lado, a captação excessiva de Ca^{2+} além da capacidade de retenção mitocondrial, pode levar a uma condição conhecida

como transição de permeabilidade mitocondrial, resultado da abertura de um poro não seletivo na membrana mitocondrial interna (ADAM-VIZI; TRETTER, 2013; STARKOV, 2010). O poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial é caracterizado por ser dependente de Ca^{2+} , ter um tamanho estimado de 14 Å, e por ser não seletivo a íons e solutos com massa molecular ≤ 1500 Da (Figura 5).

Figura 5. Modelo padrão da homeostase mitocondrial de Ca^{2+}



As mitocôndrias acumulam Ca^{2+} citosólico 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 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 $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ (T), que também estão localizados na membrana mitocondrial interna. O processo de captação de Ca^{2+} é direcionado pelo potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), enquanto o processo de liberação de Ca^{2+} é direcionado pelo gradiente de pH (ΔpH), no caso do trocador $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ (T). Elevadas concentrações de Ca^{2+} intramitocondrial estimulam a atividade de enzimas ligadas a produção de energia mitocondrial. No entanto, quando o acúmulo de Ca^{2+} ultrapassa

um certo limiar, desencadeia-se a abertura do PTP ativado pela proteína localizada na matriz ciclofilina D (Cyp D). *Legenda: RE: Retículo endoplasmático; PTP: Poro de transição de permeabilidade mitocondrial; CypD: Ciclofilina D; U: Transportador uniporte de Ca²⁺; ΔΨ: Potencial de membrana mitocondrial; T: Trocador Ca²⁺/2H⁺; ΔpH: Gradiente de pH; CR: cadeia respiratória; CAC: Ciclo do ácido cítrico.* Adaptado de (STARKOV, 2010), criado com BioRender.com.

Embora o PTP mitocondrial seja formado por proteínas com identidades ainda não totalmente elucidadas (FIGUEIRA; BARROS; CAMARGO; CASTILHO *et al.*, 2013; KWONG; MOLKENTIN, 2015; NEGINSKAYA; PAVLOV; SHEU, 2021; RIZZUTO; DE STEFANI; RAFFAELLO; MAMMUCARI, 2012), a função de algumas proteínas tem sido descrita. Destaca-se o papel da ciclofilina D (Cyp D), uma chaperona mitocondrial, que é considerado componente chave para a abertura do PTP (BERNARDI, 2013; TANVEER; VIRJI; ANDREEVA; TOTTY *et al.*, 1996) e é alvo do reconhecido inibidor da abertura do PTP, ciclosporina A (CsA) (NEGINSKAYA; PAVLOV; SHEU, 2021). Além disso, o transportador de nucleotídeos de adenina (ANT) tem sido relacionado como um modulador da abertura do PTP (BAINES; KAISER; PURCELL; BLAIR *et al.*, 2005; BAUER; MURPHY, 2020; KWONG; MOLKENTIN, 2015). O canal de ânions dependente de voltagem (VDAC) já foi proposto como constituinte do PTP (HALESTRAP, 2009), embora tem sido mostrado que essa proteína não é requerida para a abertura desse poro (BAINES; KAISER; SHEIKO; CRAIGEN *et al.*, 2007; BAUER; MURPHY, 2020; KWONG; MOLKENTIN, 2015; NEGINSKAYA; PAVLOV; SHEU, 2021). Ainda, estudos recentes implicam a F1-F0-ATP sintase na formação do PTP, embora ainda esteja em debate (CARRARO; CARRER; URBANI; BERNARDI, 2020; KWONG; MOLKENTIN, 2015; NEGINSKAYA; PAVLOV; SHEU, 2021).

A permanente abertura do PTP resulta em inchamento mitocondrial com consequente liberação de Ca²⁺ e fatores apoptogênicos intramitocondriais, como o citocromo c para o citosol (LIU; KIM; YANG; JEMMERSON *et al.*, 1996), além de despolarização mitocondrial, perda de metabólitos (Ca²⁺, Mg²⁺, GSH, NADH e NADPH),

comprometimento da síntese de ATP e morte celular (apoptose e necrose) (ADAM-VIZI; TRETTER, 2013; NICHOLLS; FERGUSON, 2013; RIZZUTO; DE STEFANI; RAFFAELLO; MAMMUCARI, 2012; ROTH; GOLDMANN; SEGAL, 1978). Muitos trabalhos *in vitro* e *in vivo* tem associado a indução do PTP com disfunção mitocondrial na presença de Ca^{2+} , demonstrando alteração nos parâmetros da homeostase bioenergética mitocondrial (MACIEL; KOWALTOWSKI; SCHWALM; RODRIGUES *et al.*, 2004; MIRANDOLA; MELO; SAITO; CASTILHO, 2010). Destaca-se também que o ataque oxidativo por espécies reativas de oxigênio é 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 melhorando da capacidade redox da mitocôndria (LEHNINGER; VERCESI; BABABUNMI, 1978; TANVEER; VIRJI; ANDREEVA; TOTTY *et al.*, 1996; ZAGO; CASTILHO; VERCESI, 2000).

1.5. METABOLISMO ENERGÉTICO CARDÍACO E RENAL

O pleno desempenho da função cardíaca é altamente dependente de adequado suporte energético. O coração humano é capaz de produzir e consumir uma média diária de 6kg de ATP (AZEVEDO; MINICUCCI; SANTOS; PAIVA *et al.*, 2013; NAGOSHI; YOSHIMURA; ROSANO; LOPASCHUK *et al.*, 2011; RITTERHOFF; TIAN, 2017; STANLEY; RECCHIA; LOPASCHUK, 2005). Quase a totalidade do ATP formado no coração (95 %) provém da OXPHOS realizada pela mitocôndria. Em condições fisiológicas de repouso, 60 a 90 % do acetil-CoA utilizado no CAC, para posterior suplementação da OXPHOS, provém da β -oxidação de ácidos graxos, e 10 a 40 % tem origem na oxidação do piruvato predominantemente pela glicólise aeróbica (AZEVEDO; MINICUCCI; SANTOS; PAIVA *et al.*, 2013; NAGOSHI; YOSHIMURA; ROSANO;

LOPASCHUK *et al.*, 2011; RITTERHOFF; TIAN, 2017; STANLEY; RECCHIA; LOPASCHUK, 2005). Em condições de jejum, a oxidação de corpos cetônicos torna-se um importante substrato energético para o coração (LOPASCHUK; KARWI; HO; PHERWANI *et al.*, 2020). O sistema cardíaco conta ainda com o reforço energético das atividades da creatina cinase (CK) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) para seu apropriado funcionamento (AZEVEDO; MINICUCCI; SANTOS; PAIVA *et al.*, 2013).

A contração cardíaca que provê suprimento de oxigênio e nutrientes a todos os órgãos do organismo consome dentre 60 a 70 % de todo ATP metabolizado pelo coração. Os 30 a 40 % de ATP restante são utilizados pela Ca^{2+} -ATPase no retículo sarcoplasmático e demais bombas iônicas (STANLEY; RECCHIA; LOPASCHUK, 2005). Neste contexto, destaca-se a importância da manutenção da homeostase celular do Ca^{2+} para a fisiologia cardíaca (DRAGO; DE STEFANI; RIZZUTO; POZZAN, 2012).

Outro tecido com alta demanda energética é o tecido renal. Cerca de 80 % do ATP é utilizado para manter a bomba Na^+ , K^+ -ATPase, fundamental para o processo de reabsorção de Na^+ e nutrientes, principalmente pelo túbulo proximal que representa a porção metabolicamente mais eficiente do néfron (MÅRTENSSON, 2019; PORTILLA, 2003). De forma similar ao tecido cardíaco, 95 % da energia na forma de ATP renal é produzida pela OXPHOS. Diversos substratos energéticos são utilizados pela mitocôndria, incluindo ácidos graxos, aminoácidos, corpos cetônicos e glicose (MÅRTENSSON, 2019).

Nos últimos anos, alterações na homeostase energética e do Ca^{2+} vem sendo relacionadas com o desenvolvimento e/ou progressão de diversas patologias que afetam o coração e rins. No tecido cardíaco, pode-se destacar a falência (AZEVEDO; MINICUCCI; SANTOS; PAIVA *et al.*, 2013; LOPASCHUK; KARWI; HO; PHERWANI *et al.*, 2020; NAGOSHI; YOSHIMURA; ROSANO; LOPASCHUK *et al.*,

2011; STANLEY; RECCHIA; LOPASCHUK, 2005), remodelamento (AZEVEDO; MINICUCCI; SANTOS; PAIVA *et al.*, 2013), e a hipertrofia cardíaca (AZEVEDO; MINICUCCI; SANTOS; PAIVA *et al.*, 2013; RITTERHOFF; TIAN, 2017), bem como já foi demonstrado anteriormente o envolvimento da abertura do PTP no dano cardíaco mediado pela reperfusão (MURPHY; STEENBERGEN, 2008). No que diz respeito ao tecido renal, a lesão renal aguda (MÅRTENSSON, 2019; RABELINK; CARMELIET, 2018) e doença renal policística (PADOVANO; PODRINI; BOLETTA; CAPLAN, 2018) também já foram associadas a alterações na homeostase energética e do Ca²⁺.

2. OBJETIVO GERAL

Considerando que a patogênese da cardiomiopatia e doença renal crônica observadas em pacientes com AP ainda não está completamente esclarecida, a presente tese teve como objetivo investigar os efeitos *in vitro* do PA, 3OHPA, 2MCA e MA sobre a bioenergética e homeostase do Ca^{2+} mitocondrial, em coração e rins de ratos jovens, bem como em cultura de linhagem celular renal (HEK-293) e cardíaca (H9c2).

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os efeitos *in vitro* do PA, 3OHPA, 2MCA e MA (0,05 – 5 mM) sobre parâmetros respiratórios (estado 3, estado 4 e estado desacoplado) em preparações mitocondriais e homogeneizado de coração e rins de ratos *Wistar* jovens, bem como em cultura de linhagem celular renal (HEK-293) e cardíaca (H9c2).
- b) Avaliar os efeitos *in vitro* do PA, 3OHPA e MA (0,05 – 5 mM) sobre a atividade de enzimas do CAC e complexos da cadeia respiratória mitocondrial e produção de ATP em preparações mitocondriais de coração e rins de ratos *Wistar* jovens.
- c) Avaliar os efeitos *in vitro* do PA e MA (1 – 5 mM) sobre o potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), conteúdo dos equivalentes reduzidos NADH e NADPH, capacidade de retenção de Ca^{2+} e inchamento, na presença ou ausência de Ca^{2+} exógeno, em preparações mitocondriais de coração e rins de ratos *Wistar* jovens.
- d) Avaliar os efeitos *in vitro* do PA e MA (2,5 e 5 mM) sobre a viabilidade em cultura de linhagem celular renal (HEK-293).

PARTE II: Artigos Científicos

Capítulo I

Disturbance of bioenergetics and calcium homeostasis provoked by metabolites accumulating in propionic acidemia in heart mitochondria of developing rats

Ana Cristina Roginski, Alessandro Wajner, Cristiane Cecatto, Simone Magagnin Wajner, Roger Frigerio Castilho, Moacir Wajner, Alexandre Umpierrez Amaral

Artigo científico publicado em

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1866 (2020)

165682

Capítulo II

Experimental evidence that maleic acid markedly compromises glutamate oxidation through inhibition of glutamate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase activities in kidney of developing rats

Ana Cristina Roginski, Cristiane Cecatto, Simone Magagnin Wajner, Fernanda Dal'Maso Camera, Roger Frigério Castilho, Moacir Wajner, Alexandre Umpierrez Amaral

Artigo científico publicado em

Molecular and Cellular Biochemistry 458 (2019) 99-112

Capítulo III

Maleic acid disrupts mitochondrial functions with the involvement of mitochondrial permeability transition in rat kidney

Ana Cristina Roginski¹, Ângela Beatris Zemni  ak¹, Rafael Aguiar Marschner², Simone
Magagnin Wajner², Rafael Teixeira Ribeiro¹, Moacir Wajner^{1,3,4}, Alexandre Umpierrez
Amaral^{1,5*}

Artigo científico *submetido* a

Journal of Bioenergetics and Biomembranes (2022)

PARTE III: Discussão e Conclusões

3. DISCUSSÃO

A AP é uma doença genética autossômica recessiva caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo de PA nos tecidos e líquidos biológicos, bem como pela presença dos ácidos orgânicos 3OHPA e 2MCA (ANDO; RASMUSSEN; NYHAN; HULL, 1972; ANDO; RASMUSSEN; WRIGHT; NYHAN, 1972; FENTON.; GRAVEL.; ROSENBLATT, 2001). O MA também já foi descrito na urina dos pacientes afetados (BERGSTROM; GRETER; LEVIN; STEEN *et al.*, 1981). Os pacientes com AP podem desenvolver sérias complicações de saúde no decorrer da vida, incluindo a cardiomiopatia (FULGENCIO-COVIAN; ALONSO-BARROSO; GUENZEL; RIVERA-BARAHONA *et al.*, 2020; TAMAYO; FULGENCIO-COVIAN; NAVARRO-GARCIA; VAL-BLASCO *et al.*, 2020; TAN; BAJAJ; MOREL; SINGH, 2018) e a doença renal crônica (BERNHEIM; DESCHENES; SCHIFF; CUSSENOT *et al.*, 2017; KASAPKARA; AKAR; YURUK YILDIRIM; TUZUN *et al.*, 2014; SHCHELOCHKOV, 2012), que geralmente pioram o prognóstico dos pacientes e cujos mecanismos patogênicos ainda estão sob debate. Neste contexto, acredita-se que a toxicidade dos metabólitos acumulados na AP contribui significativamente para o dano tecidual característico dessa doença, principalmente para o dano cerebral já demonstrado por um número elevado de trabalhos (HAIJES; JANS; VAN DER HAM; VAN HASSELT *et al.*, 2020; JURECKI; UEDA; FRAZIER; ROHR *et al.*, 2019; SHCHELOCHKOV, 2012; WAJNER, 2019). No entanto, poucos trabalhos têm investigado os mecanismos de toxicidade dos metabólitos acumulados na AP sobre outros tecidos, sendo assim, mais estudos se fazem necessários para melhor entender a contribuição desses compostos para as alterações cardíacas e renais manifestadas pelos pacientes. Cabe ressaltar que os protocolos terapêuticos muitas vezes não são efetivos na prevenção e progressão dessas manifestações clínicas, tornando a investigação dos mecanismos patogênicos responsáveis por essas alterações de extrema importância para o desenvolvimento de novas terapias.

Neste sentido, a disfunção mitocondrial pode contribuir na progressão das alterações cardíacas e renais na AP, uma vez que esses tecidos possuem alta densidade mitocondrial e demanda energética, bem como esse mecanismo patológico já foi relacionado a doenças cardíacas e renais (MÅRTENSSON, 2019; PIQUEREAU; CAFFIN; NOVOTOVA; LEMAIRE *et al.*, 2013). Essa hipótese é ainda apoiada pelo fato de que anormalidades mitocondriais já foram descritas em tecidos de pacientes com AP, como redução dos níveis de coenzima Q10 (BARUTEAU; HARGREAVES; KRYWAWYCH; CHALASANI *et al.*, 2014) e carnitina livre (MARDACH; VERITY; CEDERBAUM, 2005) em coração, redução nas atividades dos complexos I, III e IV em biópsias de músculo, fígado e coração (DE KEYZER; VALAYANNOPOULOS; BENOIST; BATTEUX *et al.*, 2009; MARDACH; VERITY; CEDERBAUM, 2005). Ressalta-se ainda que foi observada uma redução na atividade do complexo I em coração no modelo genético da AP em camundongos (GALLEGO-VILLAR; RIVERA-BARAHONA; CUEVAS-MARTIN; GUENZEL *et al.*, 2016). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* dos principais ácidos orgânicos acumulados na AP, a saber o PA, 3OHPA, 2MCA e MA, sobre a homeostase bioenergética e do Ca^{2+} mitocondrial em coração e rim de ratos *Wistar* jovens, bem como em cultura de linhagens celulares dos mesmos tecidos (H9c2 e HEK-293).

O primeiro passo na investigação da toxicidade dos ácidos orgânicos acumulados na AP sobre mitocôndrias cardíacas e renais de ratos *Wistar* machos de 30 dias de vida foi a avaliação da respirometria de alta resolução através de *Oroboros Oxygraph-2k*. Os resultados demonstraram uma potente inibição da respiração mitocondrial causada pelo MA nos estados 3 (estimulado por ATP), 4 (estimulado por oligomicina) e desacoplado (estimulado por CCCP) da respiração mitocondrial, indicando um forte efeito de inibição metabólica. As alterações causadas pelo MA sobre a respiração mitocondrial se refletem

num prejuízo energético mitocondrial, uma vez que o MA provocou uma significativa redução na RCR e na produção de ATP. Os efeitos mais severos provocados por este ácido orgânico foram observados nas condições experimentais onde as mitocôndrias foram suplementadas com substratos oxidáveis ligados ao NADH (glutamato mais malato, piruvato mais malato, glutamato, ou α -cetoglutarato), em comparação ao FADH₂ (succinato) onde se observou efeitos mais brandos. No que diz respeito aos efeitos provocados pelo PA, 3OHPA e 2MCA sobre a respiração mitocondrial, pôde-se verificar que o PA e 3OHPA inibiram de forma mais moderada os estados 3 e desacoplado quando comparados ao MA. Por outro lado, o 2MCA não provocou alterações nos parâmetros avaliados.

A inibição da respiração mitocondrial provocada pelo MA em preparações enriquecidas em mitocôndrias de rins e coração foi também observada em abordagens que visam reproduzir de maneira mais fisiológica o ambiente citosólico com a arquitetura celular preservada, como em homogeneizado desses tecidos e em cultura celular de cardiomioblastos (H9c2) e células renais (HEK-293) permeabilizadas com digitonina (GNAIGER, 2020). Em ambos os modelos foi utilizado o protocolo SUIT que permite testar de forma sequencial diferentes substratos ligados ao NADH e ao FADH₂ e os vários estados respiratórios. Pôde-se verificar uma severa redução do estado 3 e desacoplado quando utilizados substratos ligados ao NADH, reforçando a hipótese de que o MA se comporte como um potente inibidor metabólico, com elevado potencial mitotóxico.

Os resultados apresentados pelo MA estão de acordo com estudos recentes que demonstraram comprometimento da respiração mitocondrial renal causada pela administração intraperitoneal de MA (BRIONES-HERRERA; RAMIREZ-CAMACHO; ZAZUETA; TAPIA *et al.*, 2020; LIN; LIANG, 2020), bem como em cultura celular renal tratada com esse ácido orgânico (LIN; LIANG, 2020). No que diz respeito aos presentes

resultados referentes aos efeitos do MA sobre o tecido cardíaco, o presente trabalho descreveu pela primeira vez na literatura tais achados.

Na intenção de melhor compreender os mecanismos pelos quais o MA exerce sua ação de inibição metabólica, avaliou-se posteriormente o efeito desse ácido orgânico sobre a atividade dos complexos I e II da CTE, bem como das enzimas do CAC CS, malato desidrogenase (MDH) e KGDH, além da glutamato desidrogenase (GDH), que estão envolvidas na oxidação dos substratos respiratórios na qual observou-se comprometimento da respiração mitocondrial (piruvato, malato, α -cetoglutarato e glutamato) (NELSON, 2017). Não foram identificadas alterações na atividade dos complexos I e II da CTE e das enzimas CS e MDH. Por outro lado, a atividade das enzimas KGDH e GDH foi fortemente inibida pelo MA, de maneira dose-dependente em ambos os tecidos avaliados. O estudo da cinética da inibição enzimática realizado em KGDH e GDH purificadas permitiram determinar que o perfil inibitório do MA sobre essas enzimas é competitivo. Portanto, esses resultados indicam que uma inibição da KGDH e GDH pelo MA possivelmente contribui para a forte redução da respiração mitocondrial causada por esse composto em mitocôndrias utilizando substratos precursores de NADH.

No caso dos efeitos mais brandos do MA sobre a respiração mitocondrial utilizando succinato, pode-se ter contribuição da competição do MA com o succinato pelo carreador de dicarboxilatos, proteína responsável pelo transporte do succinato para a matriz mitocondrial (GNAIGER, 2020). Isso se deve ao fato de que os resultados demonstraram que a inibição do estado 3 pelo MA foi atenuada quando as mitocôndrias foram permeabilizadas com alameticina, que forma poros na membrana mitocondrial e, portanto, permite o livre acesso do succinato ao interior da mitocôndria, sem

comprometer sua oxidação pela enzima succinato desidrogenase (SDH) (GNAIGER, 2020).

Estudos prévios demonstraram ainda a capacidade do MA em sequestrar CoA (PACANIS; STRZELECKI; ROGULSKI, 1981), um cofator essencial para a atividade da KGDH e PDH (NELSON, 2017). Neste particular, observamos que os efeitos inibitórios induzidos pelo MA sobre o estado 3 da respiração mitocondrial em mitocôndrias de coração energizadas com α -cetoglutarato e piruvato mais malato foram atenuados quando o meio foi suplementado com CoA (100 μ M) exógena, sugerindo o envolvimento do sequestro de CoA nos efeitos provocados pelo MA sobre a respiração mitocondrial.

A oxidação dos substratos energéticos no CAC leva a formação das coenzimas reduzidas doadoras de elétrons para o CTE, sendo crucial para o processo de fosforilação oxidativa do ADP em ATP. O NADH e o FADH₂ estimulam o transporte de elétrons via os complexos I e II, respectivamente, pela CTE, até a transferência destes elétrons para o O₂ no complexo IV, resultando na formação de H₂O. O transporte de elétrons ocorre em concomitância com o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, através dos complexos I, III e IV, levando a formação de um gradiente eletroquímico utilizado como energia para a síntese de ATP catalisada pelo complexo V (ATP sintase) (NELSON, 2017). Cabe também destacar que o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) resultante do gradiente de prótons, além de direcionar a síntese de ATP, tem papel importante na captação de Ca²⁺ mitocondrial e outros trocadores de íons, bem como a importação de proteínas (SELLAME; BLACKER; DUCHEN, 2012).

Para melhor investigar os efeitos do MA e PA, metabólitos que apresentaram os efeitos mais significativos sobre a homeostase bioenergética mitocondrial, sobre a fisiologia mitocondrial, avaliou-se o $\Delta\Psi_m$, conteúdo de NAD(P)H, inchamento e

capacidade de retenção de Ca^{2+} , em mitocôndrias de coração e rim utilizando substratos precursores de NADH (glutamato, glutamato mais malato, piruvato mais malato, e α -cetoglutarato) e suplementadas com Ca^{2+} exógeno.

Foi possível identificar que a presença do MA induziu uma acentuada dissipação do $\Delta\Psi_m$, antes da adição de Ca^{2+} , cujos efeitos foram mais exacerbados quando utilizados os substratos energéticos glutamato ou α -cetoglutarato. Isso provavelmente seja devido à forte inibição metabólica exercida pelo MA associada à inibição da GDH e KGDH, causando um prejuízo na transferência de elétrons pela CTE e, por consequência, da formação do $\Delta\Psi_m$. Esse efeito causado pelo MA foi exacerbado pela adição de Ca^{2+} ao meio de incubação, bem como o PA também foi capaz de diminuir o $\Delta\Psi_m$ na presença desse íon, embora de forma menos intensa. Destaca-se que os efeitos ocorridos na presença de Ca^{2+} foram totalmente prevenidos por CsA e ADP, clássicos inibidores da abertura do PTP na membrana mitocondrial interna por inativar a Cyp D (BASSO; FANTE; FOWLKES; PETRONILLI *et al.*, 2005; TANVEER; VIRJI; ANDREEVA; TOTTY *et al.*, 1996) e ligar-se ao ANT (RASOLA; BERNARDI, 2011; VERCESI, 1987), respectivamente, indicando que o MA e o PA atuam como indutores do PTP dependente de Ca^{2+} .

O PTP constitui um canal na membrana mitocondrial interna não seletivo a íons e moléculas com tamanho ≤ 1500 Da, sendo que sua permanente abertura promove inchamento mitocondrial e um extravasamento de componentes da matriz mitocondrial, incluindo o Ca^{2+} , Mg^{2+} , glutatona, NADH e NADPH, bem como a liberação de fatores pró-apoptóticos, comprometendo severamente a função mitocondrial e sobrevivência celular (ADAM-VIZI; TRETTER, 2013; NICHOLLS; FERGUSON, 2013; RIZZUTO; DE STEFANI; RAFFAELLO; MAMMUCARI, 2012; ROTH; GOLDMANN; SEGAL, 1978). Neste particular, foi observado que o MA, além do PA em menor grau, foram

capazes de induzir inchamento em preparações mitocondriais de rins e coração suplementadas com Ca^{2+} , cujos efeitos foram totalmente prevenidos por CsA e ADP, corroborando com a hipótese de indução de PTP por esses ácidos orgânicos.

O conteúdo de NAD(P)H em mitocôndrias de coração e rins também foi severamente diminuído na presença do MA, possivelmente associado à inibição metabólica demonstrada por esse composto, comprometendo assim a formação dos equivalentes reduzidos. Esse feito foi novamente exacerbado pela presença de Ca^{2+} , sendo mais um fator indicativo de abertura do PTP. Interessante notar que a forte diminuição do conteúdo de NAD(P)H pelo MA ocorrida antes da adição de Ca^{2+} pode representar um mecanismo para a abertura do PTP dependente de Ca^{2+} , uma vez que é bem descrito na literatura que o favorecimento do estado redox oxidado dos nucleotídeos de piridina desempenha importante papel nesse processo (FAN; YUAN; WU; LIU *et al.*, 2018; VERCESI, 1987). Somando-se a isto, a indução do PTP pode também estar relacionada ao efeito de inibição metabólica gerado tanto pelo MA como pelo PA, também já observado para outros compostos (FAN; YUAN; WU; LIU *et al.*, 2018; MACIEL; KOWALTOWSKI; SCHWALM; RODRIGUES *et al.*, 2004).

Uma outra função mitocondrial bastante afetada pelo MA em mitocôndrias de coração foi a capacidade de retenção de Ca^{2+} , essencial para o tamponamento do Ca^{2+} celular. Quando ocorre um aumento citosólico das concentrações de Ca^{2+} , a captação mitocondrial deste íon é estimulada através do transportador uniporte de Ca^{2+} (MCU) localizado na membrana mitocondrial interna (BAUGHMAN; PEROCCHI; GIRGIS; PLOVANICH *et al.*, 2011; DE STEFANI; RAFFAELLO; TEARDO; SZABO *et al.*, 2011; KIRICHOK; KRAPIVINSKY; CLAPHAM, 2004; PAN; LIU; NGUYEN; LIU *et al.*, 2013; PENDIN; GREOTTI; POZZAN, 2014), que é impulsionada pelo $\Delta\Psi_m$ por atrair espécies carregadas positivamente, contribuindo assim para a manutenção das

concentrações citosólicas de Ca^{2+} na faixa de $0,1 \mu\text{M}$ (VERCESI; CASTILHO; KOWALTOWSKI; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018). A mitocôndria possui uma alta capacidade de armazenamento de Ca^{2+} , contudo sua afinidade é relativamente baixa quando comparada ao retículo endoplasmático (VERCESI; CASTILHO; KOWALTOWSKI; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Os resultados demonstraram que as preparações enriquecidas em mitocôndrias de coração expostas ao MA tiveram redução na capacidade de retenção de Ca^{2+} , provavelmente devido ao colapso do $\Delta\Psi_m$ e indução do PTP pelo MA. Esta função mitocondrial é de particular importância em células musculares, como a cardíaca, visto o papel crucial do Ca^{2+} na contração muscular (DRAGO; DE STEFANI; RIZZUTO; POZZAN, 2012; LUO; ANDERSON, 2013). Além disso, o Ca^{2+} governa outros processos celulares associados à motilidade e excitabilidade elétrica, além de ativar três enzimas limitantes do CAC, a saber a PDH, KGDH e IDH (OSELLAME; BLACKER; DUCHEN, 2012).

A mitocôndria desempenha uma grande variedade de funções vitais para a fisiologia celular, desde o suprimento de ATP até processos de morte celular (necrose e apoptose) (KWONG; MOLKENTIN, 2015). Dessa forma, uma disfunção mitocondrial pode ser bastante prejudicial à célula e tem sido cada vez mais associada a doenças (OSELLAME; BLACKER; DUCHEN, 2012), especialmente em tecidos altamente oxidativos e com grande massa mitocondrial, como é o caso do coração e dos rins (KWONG; MOLKENTIN, 2015; MÅRTENSSON, 2019). Além disso, um elevado número de evidências indicam que o PTP mitocondrial contribui para uma série de patologias humanas, como na lesão cardíaca decorrente da isquemia-reperfusão (BONORA; PATERGNANI; RAMACCINI; MORCIANO *et al.*, 2020), falência cardíaca (KWONG;

MOLKENTIN, 2015) e doenças renais crônicas (LINDBLOM; HIGGINS; NGUYEN; ARNSTEIN *et al.*, 2020; ZHANG; AGBORBESONG; LI, 2021).

Importante ressaltar que dois estados de abertura do PTP já foram descritos: o transiente, que é caracterizado por curta duração com papel fisiológico, permitindo uma troca rápida de solutos (por exemplo, Ca^{2+} , e espécies reativas de oxigênio) entre a matriz mitocondrial e o citosol necessários para a sinalização e reestabelecimento do balanço iônico (LINDBLOM; HIGGINS; NGUYEN; ARNSTEIN *et al.*, 2020; SHANG; GAO; LU; MA *et al.*, 2016; WANG; ZHANG; HUANG; WU *et al.*, 2016); e o permanente, que é caracterizado como de longa duração e patológico, resultando em despolarização mitocondrial com reversão da atividade da ATP sintase na intenção de reestabelecer o $\Delta\Psi_m$ (CHINOPOULOS; ADAM-VIZI, 2010; SILEIKYTE; FORTE, 2019), déficit energético, estresse oxidativo, comprometimento da homeostase de Ca^{2+} , inchamento mitocondrial e liberação de fatores pró-apoptóticos, podendo levar à morte celular (BERNARDI; RASOLA; FORTE; LIPPE, 2015).

Finalmente, no intuito de investigar se as alterações mitocondriais causadas pelo MA e PA se refletem em prejuízo na viabilidade celular, investigou-se o efeito dos metabólitos sobre a viabilidade de células renais (HEK-293) submetidas a uma pré-incubação de 24h com o MA ou PA. Pôde-se verificar que o MA afetou a capacidade das células renais em reduzir o MTT, enquanto o PA não causou efeito, indicando que o MA reduz a viabilidade celular e que apresentou maior toxicidade em comparação ao PA, corroborando com os resultados apresentados no presente trabalho. Entretanto, é importante considerar que a ausência de efeitos do PA possa também ser devido, ao menos em parte, à metabolização deste composto pelas células HEK-293 durante a pré-incubação, uma vez que elas apresentam atividade da enzima PCC, a qual está deficiente nos pacientes acometidos pela AP.

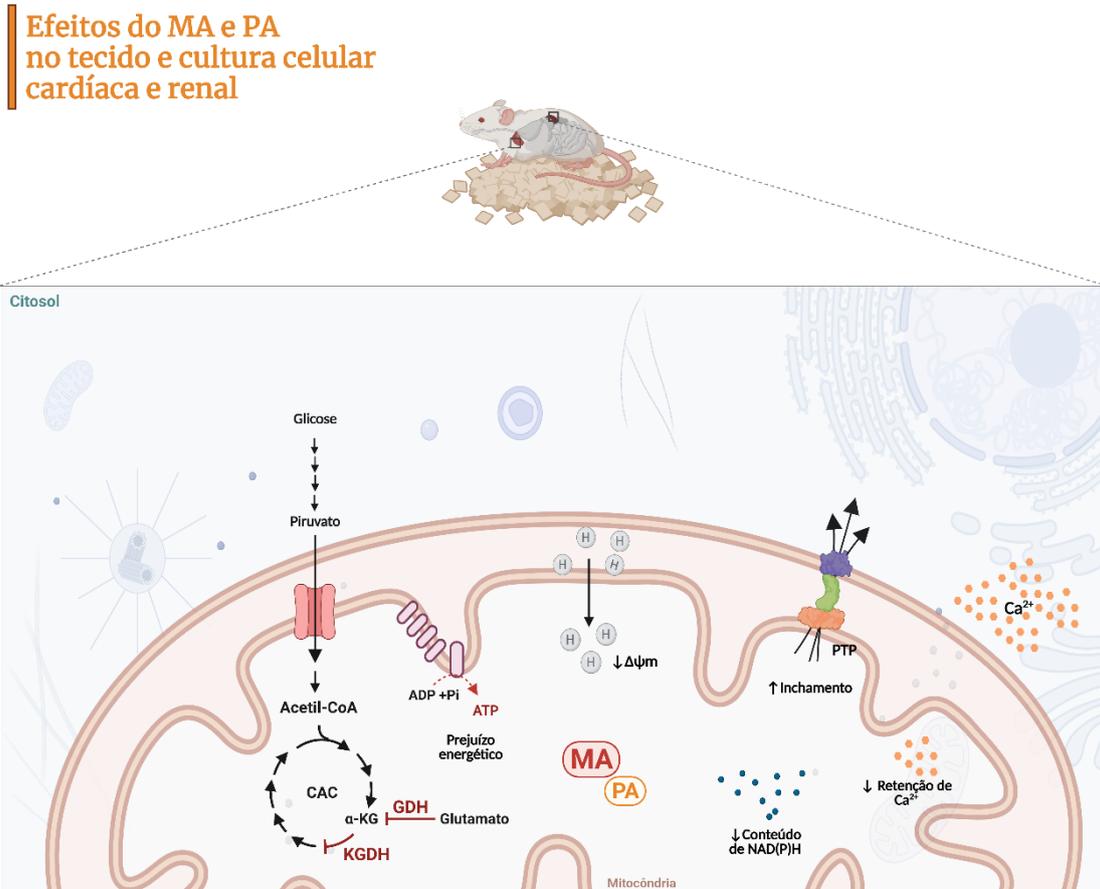
Considerando que a redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) a cristais insolúveis de formazan é dependente da atividade de desidrogenases mitocondriais (RISS; MORAVEC; NILES; DUELLMAN *et al.*, 2004; ZANATTA; RODRIGUES; AMARAL; SOUZA *et al.*, 2016), acredita-se que a redução da viabilidade celular provocada pelo MA pode estar associada a uma disfunção mitocondrial. Em conformidade com esses resultados, verificou-se também um aumento na incorporação de iodeto de propídio (PI) nas células renais pré-incubadas com MA por 24h. O PI intercala-se as bases do DNA de células com comprometimento da membrana plasmática, tornando altamente fluorescente o núcleo de células em processo de morte celular (ATALE; GUPTA; YADAV; RANI, 2014; BRANA; BENHAM; SUNDSTROM, 2002; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; ZANATTA; RODRIGUES; AMARAL; SOUZA *et al.*, 2016), embora não seja possível diferenciar o tipo de morte celular induzida. Portanto, mais experimentos se fazem necessários na intenção de melhor caracterizar o processo de morte celular induzido pelo MA.

É difícil determinar a relevância fisiopatológica dos resultados deste trabalho, embora indiquem ação mitotóxica dos metabólicos acumulados na AP, especialmente o MA e o PA. Neste contexto, destaca-se que foram utilizadas preparações celulares de coração e rins que expressavam a PCC, bem como que os níveis teciduais de MA e PA nos pacientes permanecem desconhecidos, embora as concentrações plasmáticas de PA sejam conhecidas (HOMMES; KUIPERS; ELEMA; JANSSEN *et al.*, 1968; WANG; CHRISTOPHER; WILSON; MUOIO *et al.*, 2018) e alta excreção urinária de MA já tenha sido relatada (BERGSTROM; GRETER; LEVIN; STEEN *et al.*, 1981). No entanto, salientamos que as severas alterações nas funções mitocondriais causadas pelo MA foram atingidas com concentrações tão baixas quanto 0,05 mM, enquanto os efeitos observados pelo PA sobre a função mitocondrial ocorreram com 5 mM, similar aos níveis desse

metabólito encontrados no plasma dos pacientes (HOMMES; KUIPERS; ELEMA; JANSEN *et al.*, 1968; WANG; CHRISTOPHER; WILSON; MUOIO *et al.*, 2018).

A **Figura 6** apresenta de forma esquematizada os principais resultados deste trabalho

Figura 6. Resumo esquemático dos resultados.



Fonte: A autora, 2022. Criado com BioRender.com.

4. CONCLUSÕES

Em suma, os resultados apresentados nessa tese demonstraram que o MA, bem como o PA, em menor extensão, se comporta como inibidor metabólico e indutor do PTP, levando ao prejuízo da bioenergética mitocondrial, perturbação da homeostase mitocondrial do Ca^{2+} e redução de viabilidade celular. Esses efeitos se devem, ao menos em parte, à capacidade do MA de inibir as enzimas GDH e KGDH. No caso desses resultados serem reproduzidos em tecidos ou cultura de fibroblastos de pacientes, bem como em tecidos de camundongos com o modelo genético para a AP, é possível presumir que uma disfunção mitocondrial causada pelo MA e PA pode estar associada com a cardiomiopatia e a insuficiência renal crônica frequentemente manifestadas pelos pacientes acometidos pela AP.

5. PERSPECTIVAS

- Realizar a exposição de linhagens celulares renais (HEK-293) e de cardiomioblastos (H9c2) aos ácidos orgânicos MA e PA (1 a 5 mM) por 24 horas e avaliar:
 - Parâmetros respiratórios (respiração basal, respiração ligada à produção de ATP, respiração máxima e capacidade respiratória de reserva) em cultura celular não permeabilizada medidos em *Oroboros Oxygraph-2k*;
 - Parâmetros da função mitocondrial (potencial de membrana, conteúdo de NAD(P)H, capacidade de retenção de Ca^{2+} e inchamento) em cultura celular permeabilizada com digitonina medidos em espectrofluorímetro.
 - Parâmetros de dinâmica mitocondrial (MFN2, DRP1 e OPA1), estresse de retículo endoplasmático (GRP78 e GRP75), mitofagia (PINK1) e morte celular (Caspase-3) medidos por *Western blot*.

6. REFERÊNCIAS

- ADAM-VIZI, V.; STARKOV, A. A. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. **J Alzheimers Dis**, 20 Suppl 2, p. S413-426, 2010.
- ADAM-VIZI, V.; TRETTER, L. The role of mitochondrial dehydrogenases in the generation of oxidative stress. **Neurochem Int**, 62, n. 5, p. 757-763, Apr 2013.
- AMARAL, A. U.; CECATTO, C.; CASTILHO, R. F.; WAJNER, M. 2-Methylcitric acid impairs glutamate metabolism and induces permeability transition in brain mitochondria. **J Neurochem**, 137, n. 1, p. 62-75, Apr 2016.
- ANDO, T.; RASMUSSEN, K.; NYHAN, W. L.; HULL, D. 3-hydroxypropionate: significance of -oxidation of propionate in patients with propionic acidemia and methylmalonic acidemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 69, n. 10, p. 2807-2811, Oct 1972.
- ANDO, T.; RASMUSSEN, K.; WRIGHT, J. M.; NYHAN, W. L. Isolation and identification of methylcitrate, a major metabolic product of propionate in patients with propionic acidemia. **J Biol Chem**, 247, n. 7, p. 2200-2204, Apr 10 1972.
- ANGIELSKI, S.; ROGULSKI, J. Effect of maleic acid on the kidney. I. Oxidation of Krebs cycle intermediates by various tissues of maleate-intoxicated rats. **Acta Biochim Pol**, 9, p. 357-365, 1962.
- ANVISA, A. N. D. V. S.-. **Informe nº 49 de 2012 - Esclarecimentos sobre a Fenilcetonúria.**, 2020. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/informes/copy_of_50de2012. Acesso em: 26 setembro.
- APPLEGARTH, D. A.; TOONE, J. R.; LOWRY, R. B. Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969-1996. **Pediatrics**, 105, n. 1, p. e10, Jan 2000.
- ATALE, N.; GUPTA, S.; YADAV, U. C.; RANI, V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. **J Microsc**, 255, n. 1, p. 7-19, Jul 2014.
- AZEVEDO, P. S.; MINICUCCI, M. F.; SANTOS, P. P.; PAIVA, S. A. *et al.* Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. **Cardiol Rev**, 21, n. 3, p. 135-140, May-Jun 2013.
- BAINES, C. P.; KAISER, R. A.; PURCELL, N. H.; BLAIR, N. S. *et al.* Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. **Nature**, 434, n. 7033, p. 658-662, Mar 31 2005.

BAINES, C. P.; KAISER, R. A.; SHEIKO, T.; CRAIGEN, W. J. *et al.* Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. **Nat Cell Biol**, 9, n. 5, p. 550-555, May 2007.

BARSHES, N. R.; VANATTA, J. M.; PATEL, A. J.; CARTER, B. A. *et al.* Evaluation and management of patients with propionic acidemia undergoing liver transplantation: a comprehensive review. **Pediatr Transplant**, 10, n. 7, p. 773-781, Nov 2006.

BARUTEAU, J.; HARGREAVES, I.; KRYWAWYCH, S.; CHALASANI, A. *et al.* Successful reversal of propionic acidemia associated cardiomyopathy: evidence for low myocardial coenzyme Q10 status and secondary mitochondrial dysfunction as an underlying pathophysiological mechanism. **Mitochondrion**, 17, p. 150-156, Jul 2014.

BASSO, E.; FANTE, L.; FOWLKES, J.; PETRONILLI, V. *et al.* Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. **J Biol Chem**, 280, n. 19, p. 18558-18561, May 13 2005.

BAUER, T. M.; MURPHY, E. Role of Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition Pore in Regulating Cell Death. **Circ Res**, 126, n. 2, p. 280-293, Jan 17 2020.

BAUGHMAN, J. M.; PEROCCHI, F.; GIRGIS, H. S.; PLOVANICH, M. *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**, 476, n. 7360, p. 341-345, Jun 19 2011.

BERGSTROM, T.; GRETER, J.; LEVIN, A. H.; STEEN, G. *et al.* Propionyl-CoA carboxylase deficiency: case report, effect of low-protein diet and identification of 3-oxo-2-methylvaleric acid 3-hydroxy-2-methylvaleric acid, and maleic acid in urine. **Scand J Clin Lab Invest**, 41, n. 2, p. 117-126, Apr 1981.

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

BERNARDI, P.; RASOLA, A.; FORTE, M.; LIPPE, G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. **Physiol Rev**, 95, n. 4, p. 1111-1155, Oct 2015.

BERNHEIM, S.; DESCHENES, G.; SCHIFF, M.; CUSSENOT, I. *et al.* Antenatal nephromegaly and propionic acidemia: a case report. **BMC Nephrol**, 18, n. 1, p. 110, Mar 30 2017.

BERRY, G. T.; BLUME, E. D.; WESSEL, A.; SINGH, T. *et al.* The re-occurrence of cardiomyopathy in propionic acidemia after liver transplantation. **JIMD Rep**, 54, n. 1, p. 3-8, Jul 2020.

BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 21, n. 2, p. 85-100, Feb 2020.

BODI, I.; GRUNERT, S. C.; BECKER, N.; STOELZLE-FEIX, S. *et al.* Mechanisms of acquired long QT syndrome in patients with propionic academia. **Heart Rhythm**, 13, n. 6, p. 1335-1345, Jun 2016.

BONORA, M.; PATERGNANI, S.; RAMACCINI, D.; MORCIANO, G. *et al.* Physiopathology of the Permeability Transition Pore: Molecular Mechanisms in Human Pathology. **Biomolecules**, 10, n. 7, Jul 4 2020.

BRANA, C.; BENHAM, C.; SUNDSTROM, L. A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. **Brain Res Brain Res Protoc**, 10, n. 2, p. 109-114, Oct 2002.

BRASIL. LEI Nº 14.154, DE 26 DE MAIO DE 2021. **Diário Oficial da União** 99, pp.

BREWER, E. D.; SENEKJIAN, H. O.; INCE, A.; WEINMAN, E. J. Maleic acid-induced reabsorptive dysfunction in the proximal and distal nephron. **Am J Physiol**, 245, n. 3, p. F339-344, Sep 1983.

BRIONES-HERRERA, A.; RAMIREZ-CAMACHO, I.; ZAZUETA, C.; TAPIA, E. *et al.* Altered proximal tubule fatty acid utilization, mitophagy, fission and supercomplexes arrangement in experimental Fanconi syndrome are ameliorated by sulforaphane-induced mitochondrial biogenesis. **Free Radic Biol Med**, 153, p. 54-70, Jun 2020.

BRUSQUE, A. M.; ROTTA, L. N.; TAVARES, R. G.; EMANUELLI, T. *et al.* Effects of methylmalonic and propionic acids on glutamate uptake by synaptosomes and synaptic vesicles and on glutamate release by synaptosomes from cerebral cortex of rats. **Brain Res**, 920, n. 1-2, p. 194-201, Nov 30 2001.

CARRARO, M.; CARRER, A.; URBANI, A.; BERNARDI, P. Molecular nature and regulation of the mitochondrial permeability transition pore(s), drug target(s) in cardioprotection. **J Mol Cell Cardiol**, 144, p. 76-86, Jul 2020.

CHAPMAN, K. A. Practical management of organic acidemias. **Translational Science of Rare Diseases**, 4, n. 3-4, p. 121-131, 2019.

CHAPMAN, K. A.; GRAMER, G.; VIAL, S.; SUMMAR, M. L. Incidence of maple syrup urine disease, propionic acidemia, and methylmalonic aciduria from newborn screening data. **Mol Genet Metab Rep**, 15, p. 106-109, Jun 2018.

CHAPMAN, K. A.; SUMMAR, M. L. Propionic acidemia consensus conference summary. **Mol Genet Metab**, 105, n. 1, p. 3-4, Jan 2012.

CHEEMA-DHADLI, S.; LEZNOFF, C. C.; HALPERIN, M. L. Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. **Pediatr Res**, 9, n. 12, p. 905-908, Dec 1975.

CHINOPOULOS, C.; ADAM-VIZI, V. Mitochondria as ATP consumers in cellular pathology. **Biochim Biophys Acta**, 1802, n. 1, p. 221-227, Jan 2010.

CHOI, H.; KIM, I. S.; MUN, J. Y. Propionic acid induces dendritic spine loss by MAPK/ERK signaling and dysregulation of autophagic flux. **Mol Brain**, 13, n. 1, p. 86, Jun 2 2020.

COUDE, F. X.; SWEETMAN, L.; NYHAN, W. L. Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. **J Clin Invest**, 64, n. 6, p. 1544-1551, Dec 1979.

CUDRE-CUNG, H. P.; ZAVADAKOVA, P.; DO VALE-PEREIRA, S.; REMACLE, N. *et al.* Ammonium accumulation is a primary effect of 2-methylcitrate exposure in an in vitro model for brain damage in methylmalonic aciduria. **Mol Genet Metab**, 119, n. 1-2, p. 57-67, Sep 2016.

DAVISON, J. E.; DAVIES, N. P.; WILSON, M.; SUN, Y. *et al.* MR spectroscopy-based brain metabolite profiling in propionic acidemia: metabolic changes in the basal ganglia during acute decompensation and effect of liver transplantation. **Orphanet J Rare Dis**, 6, p. 19, May 9 2011.

DE ALMEIDA, L. M.; FUNCHAL, C.; GOTTFRIED, C.; WAJNER, M. *et al.* Propionic acid induces cytoskeletal alterations in cultured astrocytes from rat cerebral cortex. **Metab Brain Dis**, 21, n. 1, p. 51-62, Mar 2006.

DE KEYZER, Y.; VALAYANNOPOULOS, V.; BENOIST, J. F.; BATTEUX, F. *et al.* Multiple OXPHOS deficiency in the liver, kidney, heart, and skeletal muscle of patients with methylmalonic aciduria and propionic aciduria. **Pediatr Res**, 66, n. 1, p. 91-95, Jul 2009.

DE STEFANI, D.; RAFFAELLO, A.; TEARDO, E.; SZABO, I. *et al.* A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**, 476, n. 7360, p. 336-340, Jun 19 2011.

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**, 109, n. 32, p. 12986-12991, Aug 7 2012.

EIAM-ONG, S.; SPOHN, M.; KURTZMAN, N. A.; SABATINI, S. Insights into the biochemical mechanism of maleic acid-induced Fanconi syndrome. **Kidney Int**, 48, n. 5, p. 1542-1548, Nov 1995.

EL-ANSARY, A.; AL-SALEM, H. S.; ASMA, A.; AL-DBASS, A. Glutamate excitotoxicity induced by orally administered propionic acid, a short chain fatty acid can be ameliorated by bee pollen. **Lipids Health Dis**, 16, n. 1, p. 96, May 22 2017.

EZGU, F. Inborn Errors of Metabolism. **Adv Clin Chem**, 73, p. 195-250, 2016.

FAAS, M. M.; DE VOS, P. Mitochondrial function in immune cells in health and disease. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1866, n. 10, p. 165845, Oct 1 2020.

FAN, X. Y.; YUAN, L.; WU, C.; LIU, Y. J. *et al.* Mitochondrial toxicity of organic arsenicals: membrane permeability transition pore opening and respiratory dysfunction. **Toxicol Res (Camb)**, 7, n. 2, p. 191-200, Mar 1 2018.

FENTON., W. A.; GRAVEL., R. A.; ROSENBLATT, D. S. Disorders of Propionate and Methylmalonate Metabolism. *In: The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* : McGraw-Hill Education, 2001 2001. cap. 94, p. 2165-2193.

FERREIRA, C. R.; VAN KARNEBEEK, C. D. M. Inborn errors of metabolism. **Handb Clin Neurol**, 162, p. 449-481, 2019.

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. A.; CASTILHO, R. F. *et al.* Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxid Redox Signal**, 18, n. 16, p. 2029-2074, Jun 1 2013.

FONTELLA, F. U.; PULROLNIK, V.; GASSEN, E.; WANNMACHER, C. M. *et al.* Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. **Neuroreport**, 11, n. 3, p. 541-544, Feb 28 2000.

FOREMAN, J. W. Fanconi Syndrome. **Pediatr Clin North Am**, 66, n. 1, p. 159-167, Feb 2019.

FRASER, J. L.; VENDITTI, C. P. Methylmalonic and propionic acidemias: clinical management update. **Curr Opin Pediatr**, 28, n. 6, p. 682-693, Dec 2016.

FULGENCIO-COVIAN, A.; ALONSO-BARROSO, E.; GUENZEL, A. J.; RIVERA-BARAHONA, A. *et al.* Pathogenic implications of dysregulated miRNAs in propionic acidemia related cardiomyopathy. **Transl Res**, 218, p. 43-56, Apr 2020.

GALLEGO-VILLAR, L.; RIVERA-BARAHONA, A.; CUEVAS-MARTIN, C.; GUENZEL, A. *et al.* In vivo evidence of mitochondrial dysfunction and altered redox homeostasis in a genetic mouse model of propionic acidemia: Implications for the pathophysiology of this disorder. **Free Radic Biol Med**, 96, p. 1-12, Jul 2016.

GNAIGER, E. **Mitochondrial pathways and respiratory control. an introduction to OXPHOS analysis.** 5th ed. ed. Bioenerg Commun 2020. 122 p.

GREGERSEN, N. The specific inhibition of the pyruvate dehydrogenase complex from pig kidney by propionyl-CoA and isovaleryl-Co-A. **Biochem Med**, 26, n. 1, p. 20-27, Aug 1981.

GRUNERT, S. C.; MULLERLEILE, S.; DE SILVA, L.; BARTH, M. *et al.* Propionic acidemia: clinical course and outcome in 55 pediatric and adolescent patients. **Orphanet J Rare Dis**, 8, p. 6, Jan 10 2013.

GUENZEL, A. J.; HOFHERR, S. E.; HILLESTAD, M.; BARRY, M. *et al.* Generation of a hypomorphic model of propionic acidemia amenable to gene therapy testing. **Mol Ther**, 21, n. 7, p. 1316-1323, Jul 2013.

HAIJES, H. A.; JANS, J. J. M.; VAN DER HAM, M.; VAN HASSELT, P. M. *et al.* Understanding acute metabolic decompensation in propionic and methylmalonic acidemias: a deep metabolic phenotyping approach. **Orphanet J Rare Dis**, 15, n. 1, p. 68, Mar 6 2020.

HALESTRAP, A. P. What is the mitochondrial permeability transition pore? **J Mol Cell Cardiol**, 46, n. 6, p. 821-831, Jun 2009.

HERBER, S.; SCHWARTZ, I. V.; NALIN, T.; OLIVEIRA NETTO, C. B. *et al.* Maple syrup urine disease in Brazil: a panorama of the last two decades. **J Pediatr (Rio J)**, 91, n. 3, p. 292-298, May-Jun 2015.

HOMMES, F. A.; KUIPERS, J. R.; ELEMA, J. D.; JANSEN, J. F. *et al.* Propionicacidemia, a new inborn error of metabolism. **Pediatr Res**, 2, n. 6, p. 519-524, Nov 1968.

IMPERLINI, E.; SANTORELLI, L.; ORRU, S.; SCOLAMIERO, E. *et al.* Mass Spectrometry-Based Metabolomic and Proteomic Strategies in Organic Acidemias. **Biomed Res Int**, 2016, p. 9210408, 2016.

JAFARI, P.; BRAISSANT, O.; ZAVADAKOVA, P.; HENRY, H. *et al.* Brain damage in methylmalonic aciduria: 2-methylcitrate induces cerebral ammonium accumulation and apoptosis in 3D organotypic brain cell cultures. **Orphanet J Rare Dis**, 8, p. 4, Jan 8 2013.

JAVADOV, S.; KOZLOV, A. V.; CAMARA, A. K. S. Mitochondria in Health and Diseases. **Cells**, 9, n. 5, May 9 2020.

JOSHI, S. N.; HASHIM, J.; VENUGOPALAN, P. Pattern of inborn errors of metabolism in an Omani population of the Arabian Peninsula. **Ann Trop Paediatr**, 22, n. 1, p. 93-96, Mar 2002.

JURECKI, E.; UEDA, K.; FRAZIER, D.; ROHR, F. *et al.* Nutrition management guideline for propionic acidemia: An evidence- and consensus-based approach. **Mol Genet Metab**, 126, n. 4, p. 341-354, Apr 2019.

KASAPKARA, C. S.; AKAR, M.; YURUK YILDIRIM, Z. N.; TUZUN, H. *et al.* Severe renal failure and hyperammonemia in a newborn with propionic acidemia: effects of treatment on the clinical course. **Ren Fail**, 36, n. 3, p. 451-452, Apr 2014.

KIRICHOK, Y.; KRAPIVINSKY, G.; CLAPHAM, D. E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. **Nature**, 427, n. 6972, p. 360-364, Jan 22 2004.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, 495, n. 1-2, p. 12-15, Apr 20 2001.

KWONG, J. Q.; MOLKENTIN, J. D. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. **Cell Metab**, 21, n. 2, p. 206-214, Feb 3 2015.

LANPHER, B.; BRUNETTI-PIERRI, N.; LEE, B. Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. **Nat Rev Genet**, 7, n. 6, p. 449-460, Jun 2006.

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**, 75, n. 4, p. 1690-1694, Apr 1978.

LEONARD, J. V.; MORRIS, A. A. Inborn errors of metabolism around time of birth. **Lancet**, 356, n. 9229, p. 583-587, Aug 12 2000.

LIN, H. Y.-H.; LIANG, C.-J. Roles of Mitochondrial Dysfunction in Maleic Acid-induced Acute Kidney Injury. **The FASEB Journal**, 34, n. S1, p. 1-1, 2020.

LINDBLOM, R. S. J.; HIGGINS, G. C.; NGUYEN, T. V.; ARNSTEIN, M. *et al.* Delineating a role for the mitochondrial permeability transition pore in diabetic kidney disease by targeting cyclophilin D. **Clin Sci (Lond)**, 134, n. 2, p. 239-259, Jan 31 2020.

LINDNER, M.; GRAMER, G.; HAEGE, G.; FANG-HOFFMANN, J. *et al.* Efficacy and outcome of expanded newborn screening for metabolic diseases--report of 10 years from South-West Germany. **Orphanet J Rare Dis**, 6, p. 44, Jun 20 2011.

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R. *et al.* Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, 86, n. 1, p. 147-157, Jul 12 1996.

LOBZHANIDZE, G.; JAPARIDZE, N.; LORDKIPANIDZE, T.; RZAYEV, F. *et al.* Behavioural and brain ultrastructural changes following the systemic administration of propionic acid in adolescent male rats. Further development of a rodent model of autism. **Int J Dev Neurosci**, 80, n. 2, p. 139-156, Apr 2020.

LONGO, N.; PRICE, L. B.; GAPPMAIER, E.; CANTOR, N. L. *et al.* Anaplerotic therapy in propionic acidemia. **Mol Genet Metab**, 122, n. 1-2, p. 51-59, Sep 2017.

LOPASCHUK, G. D.; KARWI, Q. G.; HO, K. L.; PHERWANI, S. *et al.* Ketone metabolism in the failing heart. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**, 1865, n. 12, p. 158813, Dec 2020.

LUCKE, T.; PEREZ-CERDA, C.; BAUMGARTNER, M.; FOWLER, B. *et al.* Propionic acidemia: unusual course with late onset and fatal outcome. **Metabolism**, 53, n. 6, p. 809-810, Jun 2004.

LUO, M.; ANDERSON, M. E. Mechanisms of altered Ca²⁺ handling in heart failure. **Circ Res**, 113, n. 6, p. 690-708, Aug 30 2013.

MACFABE, D. F.; CAIN, N. E.; BOON, F.; OSSENKOPP, K. P. *et al.* Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. **Behav Brain Res**, 217, n. 1, p. 47-54, Feb 2 2011.

MACIEL, E. N.; KOWALTOWSKI, A. J.; SCHWALM, F. D.; RODRIGUES, J. M. *et al.* Mitochondrial permeability transition in neuronal damage promoted by Ca²⁺ and respiratory chain complex II inhibition. **J Neurochem**, 90, n. 5, p. 1025-1035, Sep 2004.

MAESAKA, J. K.; MCCAFFERY, M. Evidence for renal tubular leakage in maleic acid-induced Fanconi syndrome. **Am J Physiol**, 239, n. 5, p. F507-513, Nov 1980.

MARDACH, R.; VERITY, M. A.; CEDERBAUM, S. D. Clinical, pathological, and biochemical studies in a patient with propionic acidemia and fatal cardiomyopathy. **Mol Genet Metab**, 85, n. 4, p. 286-290, Aug 2005.

MÅRTENSSON, J. Chapter 10 - Renal Energy Consumption and Metabolism. *In*: RONCO, C.; BELLOMO, R., *et al* (Ed.). **Critical Care Nephrology (Third Edition)**. Philadelphia: Elsevier, 2019. p. 59-64.e51.

MARTIN-REQUERO, A.; CORKEY, B. E.; CERDAN, S.; WALAJTYS-RODE, E. *et al*. Interactions between alpha-ketoisovalerate metabolism and the pathways of gluconeogenesis and urea synthesis in isolated hepatocytes. **J Biol Chem**, 258, n. 6, p. 3673-3681, Mar 25 1983.

MCLEESE, J.; THIERY, G.; BERGERON, M. Maleate modifies apical endocytosis and permeability of endoplasmic reticulum membranes in kidney tubular cells. **Cell Tissue Res**, 283, n. 1, p. 29-37, Jan 1996.

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**, 88, n. 3, p. 630-639, Feb 15 2010.

MIRZA, R.; SHARMA, B. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist benefited propionic acid induced autism-like behavioral phenotypes in rats by attenuation of neuroinflammation and oxidative stress. **Chem Biol Interact**, 311, p. 108758, Sep 25 2019.

MOAMMAR, H.; CHERIYAN, G.; MATHEW, R.; AL-SANNAA, N. Incidence and patterns of inborn errors of metabolism in the Eastern Province of Saudi Arabia, 1983-2008. **Ann Saudi Med**, 30, n. 4, p. 271-277, Jul-Aug 2010.

MORLAND, C.; FROLAND, A. S.; PETTERSEN, M. N.; STORM-MATHISEN, J. *et al*. Propionate enters GABAergic neurons, inhibits GABA transaminase, causes GABA accumulation and lethargy in a model of propionic acidemia. **Biochem J**, 475, n. 4, p. 749-758, Feb 16 2018.

MUJAIS, S. K. Maleic acid-induced proximal tubulopathy: Na:K pump inhibition. **J Am Soc Nephrol**, 4, n. 2, p. 142-147, Aug 1993.

MURPHY, E.; STEENBERGEN, C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. **Physiol Rev**, 88, n. 2, p. 581-609, Apr 2008.

NAGOSHI, T.; YOSHIMURA, M.; ROSANO, G. M.; LOPASCHUK, G. D. *et al.* Optimization of cardiac metabolism in heart failure. **Curr Pharm Des**, 17, n. 35, p. 3846-3853, Dec 2011.

NEGINSKAYA, M. A.; PAVLOV, E. V.; SHEU, S. S. Electrophysiological properties of the mitochondrial permeability transition pores: Channel diversity and disease implication. **Biochim Biophys Acta Bioenerg**, 1862, n. 3, p. 148357, Mar 1 2021.

NELSON, D. L. **Lehninger principles of biochemistry**. 7th ed ed. New York, NY: W.H. Freeman, 2017. 9781319108243.

NGUYEN, N. H.; MORLAND, C.; GONZALEZ, S. V.; RISE, F. *et al.* Propionate increases neuronal histone acetylation, but is metabolized oxidatively by glia. Relevance for propionic acidemia. **J Neurochem**, 101, n. 3, p. 806-814, May 2007.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 4**. 4th Edition ed. Academic Press, May 20, 2013 2013. 9780123884251.

NOCKER, A.; CHEUNG, C. Y.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **J Microbiol Methods**, 67, n. 2, p. 310-320, Nov 2006.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**, 148, n. 6, p. 1145-1159, Mar 16 2012.

ONISHI, M.; YAMANO, K.; SATO, M.; MATSUDA, N. *et al.* Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. **EMBO J**, 40, n. 3, p. e104705, Feb 1 2021.

OSELLAME, L. D.; BLACKER, T. S.; DUCHEN, M. R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 26, n. 6, p. 711-723, Dec 2012.

PACANIS, A.; STRZELECKI, T.; ROGULSKI, J. Effects of maleate on the content of CoA and its derivatives in rat kidney mitochondria. **J Biol Chem**, 256, n. 24, p. 13035-13038, Dec 25 1981.

PADOVANO, V.; PODRINI, C.; BOLETTA, A.; CAPLAN, M. J. Metabolism and mitochondria in polycystic kidney disease research and therapy. **Nat Rev Nephrol**, 14, n. 11, p. 678-687, Nov 2018.

PAN, X.; LIU, J.; NGUYEN, T.; LIU, C. *et al.* The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. **Nat Cell Biol**, 15, n. 12, p. 1464-1472, Dec 2013.

PARK, K. C.; KRYWAWYCH, S.; RICHARD, E.; DESVIAT, L. R. *et al.* Cardiac Complications of Propionic and Other Inherited Organic Acidemias. **Front Cardiovasc Med**, 7, p. 617451, 2020.

PATEL, T. B.; DEBUYSERE, M. S.; OLSON, M. S. The effect of propionate on the regulation of the pyruvate dehydrogenase complex in the rat liver. **Arch Biochem Biophys**, 220, n. 2, p. 405-414, Feb 1 1983.

PENA, L.; BURTON, B. K. Survey of health status and complications among propionic acidemia patients. **Am J Med Genet A**, 158A, n. 7, p. 1641-1646, Jul 2012.

PENA, L.; FRANKS, J.; CHAPMAN, K. A.; GROPMAN, A. *et al.* Natural history of propionic acidemia. **Mol Genet Metab**, 105, n. 1, p. 5-9, Jan 2012.

PENDIN, D.; GREOTTI, E.; POZZAN, T. The elusive importance of being a mitochondrial Ca(2+) uniporter. **Cell Calcium**, 55, n. 3, p. 139-145, Mar 2014.

PETTENUZZO, L. F.; SCHUCK, P. F.; FONTELLA, F.; WANNMACHER, C. M. *et al.* Ascorbic acid prevents cognitive deficits caused by chronic administration of propionic acid to rats in the water maze. **Pharmacol Biochem Behav**, 73, n. 3, p. 623-629, Oct 2002.

PINTO, A. L.; RAYMOND, K. M.; BRUCK, I.; ANTONIUK, S. A. [Prevalence study of biotinidase deficiency in newborns]. **Rev Saude Publica**, 32, n. 2, p. 148-152, Apr 1998.

PIQUEREAU, J.; CAFFIN, F.; NOVOTOVA, M.; LEMAIRE, C. *et al.* Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? **Front Physiol**, 4, p. 102, 2013.

POPOV, L. D. Mitochondrial biogenesis: An update. **J Cell Mol Med**, 24, n. 9, p. 4892-4899, May 2020.

PORTILLA, D. Energy metabolism and cytotoxicity. **Semin Nephrol**, 23, n. 5, p. 432-438, Sep 2003.

PREETI SHARMA, P. K., MAYURIKA S. TYAGI, RACHNA SHARMA, DHOT PS. Prevalence of inborn errors of metabolism in neonates. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 12, n. 5, p. BC07-BC13, 2018.

QUINTERO, J.; MOLERA, C.; JUAMPEREZ, J.; REDECILLAS, S. *et al.* The Role of Liver Transplantation in Propionic Acidemia. **Liver Transpl**, 24, n. 12, p. 1736-1745, Dec 2018.

RABELINK, T. J.; CARMELIET, P. Renal metabolism in 2017: Glycolytic adaptation and progression of kidney disease. **Nat Rev Nephrol**, 14, n. 2, p. 75-76, Feb 2018.

RAGHUVVEER, T. S.; GARG, U.; GRAF, W. D. Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: an update. **Am Fam Physician**, 73, n. 11, p. 1981-1990, Jun 1 2006.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**, 50, n. 3, p. 222-233, Sep 2011.

REDDY, N.; CALLONI, S. F.; VERNON, H. J.; BOLTSHAUSER, E. *et al.* Neuroimaging Findings of Organic Acidemias and Aminoacidopathies. **Radiographics**, 38, n. 3, p. 912-931, May-Jun 2018.

RIGO, F. K.; PASQUETTI, L.; MALFATTI, C. R.; FIGHERA, M. R. *et al.* Propionic acid induces convulsions and protein carbonylation in rats. **Neurosci Lett**, 408, n. 2, p. 151-154, Nov 13 2006.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S. *et al.* Cell Viability Assays. *In: MARKOSSIAN, S.; GROSSMAN, A., et al (Ed.). Assay Guidance Manual.* Bethesda (MD), 2004.

RITTERHOFF, J.; TIAN, R. Metabolism in cardiomyopathy: every substrate matters. **Cardiovasc Res**, 113, n. 4, p. 411-421, Mar 15 2017.

RIVERA-BARAHONA, A.; ALONSO-BARROSO, E.; PEREZ, B.; MURPHY, M. P. *et al.* Treatment with antioxidants ameliorates oxidative damage in a mouse model of propionic acidemia. **Mol Genet Metab**, 122, n. 1-2, p. 43-50, Sep 2017.

RIZZUTO, R.; DE STEFANI, D.; RAFFAELLO, A.; MAMMUCARI, C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 9, p. 566-578, Sep 2012.

ROTH, K. S.; GOLDMANN, D. R.; SEGAL, S. Developmental aspects of maleic acid-induced inhibition of sugar and amino acid transport in the rat renal tubule. **Pediatr Res**, 12, n. 12, p. 1121-1126, Dec 1978.

SAITO, A.; CASTILHO, R. F. Inhibitory effects of adenine nucleotides on brain mitochondrial permeability transition. **Neurochem Res**, 35, n. 11, p. 1667-1674, Nov 2010.

SANDERSON, S.; GREEN, A.; PREECE, M. A.; BURTON, H. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. **Arch Dis Child**, 91, n. 11, p. 896-899, Nov 2006.

SAUDUBRAY, J. M.; GARCIA-CAZORLA, A. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. **Pediatr Clin North Am**, 65, n. 2, p. 179-208, Apr 2018.

SAUDUBRAY, J. M.; MOCHEL, F.; LAMARI, F.; GARCIA-CAZORLA, A. Proposal for a simplified classification of IMD based on a pathophysiological approach: A practical guide for clinicians. **J Inherit Metab Dis**, 42, n. 4, p. 706-727, Jul 2019.

SAUDUBRAY, J. M.; SEDEL, F.; WALTER, J. H. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. **J Inherit Metab Dis**, 29, n. 2-3, p. 261-274, Apr-Jun 2006.

SCHARER, K.; YOSHIDA, T.; VOYER, L.; BERLOW, S. *et al.* Impaired renal gluconeogenesis and energy metabolism in maleic acid-induced nephropathy in rats. **Res Exp Med (Berl)**, 157, n. 2, p. 136-152, 1972.

SCHWAB, M. A.; SAUER, S. W.; OKUN, J. G.; NIJTMANS, L. G. *et al.* Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. **Biochem J**, 398, n. 1, p. 107-112, Aug 15 2006.

SHANG, W.; GAO, H.; LU, F.; MA, Q. *et al.* Cyclophilin D regulates mitochondrial flashes and metabolism in cardiac myocytes. **J Mol Cell Cardiol**, 91, p. 63-71, Feb 2016.

SHCHELOCHKOV, O. A. C., NURIA; VENDITTI, CHARLES. Propionic Acidemia. *In: ADAM MP, A. H., PAGON RA, ET AL. (Ed.). GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92946/>.*

SILEIKYTE, J.; FORTE, M. The Mitochondrial Permeability Transition in Mitochondrial Disorders. **Oxid Med Cell Longev**, 2019, p. 3403075, 2019.

SSIEM, S. F. T. S. O. I. E. O. M.-. **Classification of Inborn Errors of Metabolism**. 2012. Disponível em: <http://www.ssiem.org/images/centralstore/resources/SSIEMClassificationIEM2011.pdf>. Acesso em: 09/27.

STANLEY, W. C.; RECCHIA, F. A.; LOPASCHUK, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. **Physiol Rev**, 85, n. 3, p. 1093-1129, Jul 2005.

STARKOV, A. A. The molecular identity of the mitochondrial Ca²⁺ sequestration system. **FEBS J**, 277, n. 18, p. 3652-3663, Sep 2010.

STUMPF, D. A.; MCAFEE, J.; PARKS, J. K.; EGUREN, L. Propionate inhibition of succinate:CoA ligase (GDP) and the citric acid cycle in mitochondria. **Pediatr Res**, 14, n. 10, p. 1127-1131, Oct 1980.

TAJIMA, G.; KAGAWA, R.; SAKURA, F.; NAKAMURA-UTSUNOMIYA, A. *et al.* Current Perspectives on Neonatal Screening for Propionic Acidemia in Japan: An Unexpectedly High Incidence of Patients with Mild Disease Caused by a Common PCCB Variant. **Int J Neonatal Screen**, 7, n. 3, Jun 28 2021.

TAMAYO, M.; FULGENCIO-COVIAN, A.; NAVARRO-GARCIA, J. A.; VAL-BLASCO, A. *et al.* Intracellular calcium mishandling leads to cardiac dysfunction and ventricular arrhythmias in a mouse model of propionic acidemia. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1866, n. 1, p. 165586, Jan 1 2020.

TAN, N. S.; BAJAJ, R. R.; MOREL, C.; SINGH, S. M. Metabolic cardiomyopathy from propionic acidemia precipitating cardiac arrest in a 25-year-old man. **CMAJ**, 190, n. 29, p. E883-E887, Jul 23 2018.

TANVEER, A.; VIRJI, S.; ANDREEVA, L.; TOTTY, N. F. *et al.* Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. **Eur J Biochem**, 238, n. 1, p. 166-172, May 15 1996.

THOMAS, R. H.; FOLEY, K. A.; MEPHAM, J. R.; TICHENOFF, L. J. *et al.* Altered brain phospholipid and acylcarnitine profiles in propionic acid infused rodents: further development of a potential model of autism spectrum disorders. **J Neurochem**, 113, n. 2, p. 515-529, Apr 2010.

TUNCEL, A. T.; RUPPERT, T.; WANG, B. T.; OKUN, J. G. *et al.* Maleic Acid--but Not Structurally Related Methylmalonic Acid--Interrupts Energy Metabolism by Impaired Calcium Homeostasis. **PLoS One**, 10, n. 6, p. e0128770, 2015.

UWAI, Y.; NABEKURA, T. Effect of Experimental Fanconi Syndrome on Tubular Reabsorption of Lithium in Rats. **Pharmacology**, 106, n. 7-8, p. 446-450, 2021.

VARA, R.; TURNER, C.; MUNDY, H.; HEATON, N. D. *et al.* Liver transplantation for propionic acidemia in children. **Liver Transpl**, 17, n. 6, p. 661-667, Jun 2011.

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**, 252, n. 1, p. 171-178, Jan 1987.

VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; DE OLIVEIRA, H. C. F. *et al.* Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. **Free Radic Biol Med**, 129, p. 1-24, Dec 2018.

VIDAILHET, M. **Inborn Metabolic Diseases**. 6th ed. Springer Berlin Heidelberg, 2016. 978-3-662-49769-2.

WAJNER, M. Neurological manifestations of organic acidurias. **Nat Rev Neurol**, 15, n. 5, p. 253-271, May 2019.

WAJNER, M.; GOODMAN, S. I. Disruption of mitochondrial homeostasis in organic acidurias: insights from human and animal studies. **J Bioenerg Biomembr**, 43, n. 1, p. 31-38, Feb 2011.

WANG, X.; ZHANG, X.; HUANG, Z.; WU, D. *et al.* Protons Trigger Mitochondrial Flashes. **Biophys J**, 111, n. 2, p. 386-394, Jul 26 2016.

WANG, Y.; CHRISTOPHER, B. A.; WILSON, K. A.; MUOIO, D. *et al.* Propionate-induced changes in cardiac metabolism, notably CoA trapping, are not altered by l-carnitine. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 315, n. 4, p. E622-E633, Oct 1 2018.

WEIDMAN, S. W.; DRYSDALE, G. R. The biosynthesis of methylcitrate. **Biochem J**, 177, n. 1, p. 169-174, Jan 1 1979.

WILSON, K. A.; HAN, Y.; ZHANG, M.; HESS, J. P. *et al.* Inter-relations between 3-hydroxypropionate and propionate metabolism in rat liver: relevance to disorders of propionyl-CoA metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 313, n. 4, p. E413-E428, Oct 1 2017.

WONGKITTICHOTE, P.; AH MEW, N.; CHAPMAN, K. A. Propionyl-CoA carboxylase - A review. **Mol Genet Metab**, 122, n. 4, p. 145-152, Dec 2017.

WYSE, A. T.; BRUSQUE, A. M.; SILVA, C. G.; STRECK, E. L. *et al.* Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase from rat brain cortex by propionic acid. **Neuroreport**, 9, n. 8, p. 1719-1721, Jun 1 1998.

ZAGER, R. A.; JOHNSON, A. C.; NAITO, M.; BOMSZTYK, K. Maleate nephrotoxicity: mechanisms of injury and correlates with ischemic/hypoxic tubular cell death. **Am J Physiol Renal Physiol**, 294, n. 1, p. F187-197, Jan 2008.

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**, 478, n. 1-2, p. 29-33, Jul 28 2000.

ZANATTA, A.; RODRIGUES, M. D.; AMARAL, A. U.; SOUZA, D. G. *et al.* Ornithine and Homocitrulline Impair Mitochondrial Function, Decrease Antioxidant Defenses and

Induce Cell Death in Menadione-Stressed Rat Cortical Astrocytes: Potential Mechanisms of Neurological Dysfunction in HHH Syndrome. **Neurochem Res**, 41, n. 9, p. 2190-2198, Sep 2016.

ZAYED, H. Propionic acidemia in the Arab World. **Gene**, 564, n. 2, p. 119-124, Jun 15 2015.

ZHANG, X.; AGBORBESONG, E.; LI, X. The Role of Mitochondria in Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease and Its Therapeutic Potential. **Int J Mol Sci**, 22, n. 20, Oct 19 2021.

7. ANEXOS

7.1. CARTA DE APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 35344

Título: INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DE METABÓLITOS ACUMULADOS NA ACIDEMIA PROPIÔNICA SOBRE A HOMEOSTASE ENERGÉTICA, REDOX E DO CÁLCIO EM CÉREBRO, CORAÇÃO E RIM DE RATOS JOVENS: IMPLICAÇÕES PARA A PATOGÊNESE DESS

Vigência: 17/05/2018 à 30/04/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MOACIR WAJNER - coordenador desde 17/05/2018
Alexandre Umpierrez Amaral - pesquisador desde 17/05/2018
CRISTIANE CECATTO - Aluno de Doutorado desde 17/05/2018
Ana Cristina Roginski - Aluno de Doutorado desde 17/05/2018

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 192 ratos Wistar machos com 30 dias de vida, oriundo do biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 17 de Agosto de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética

7.2. LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desfechos decorrentes da alteração genética subjacentes aos EIM.....	2
Figura 2. Metabolismo do propionil-CoA.....	6
Figura 3. Esquema do ciclo do ácido cítrico (CA) e fosforilação oxidativa (OXPHOS).....	16
Figura 4. Estados da respiração mitocondrial	17
Figura 5. Modelo padrão da homeostase mitocondrial de Ca^{2+}	19
Figura 6. Resumo esquemático dos resultados	89

7.3. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos EIM, segundo a SSIEM	4
---	---