

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Nícolas Manzke Glänzel

**ESTUDO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA NEUROFISIOPATOLOGIA DA
DEFICIÊNCIA DA SULFITO OXIDASE EM RATOS NEONATOS E JOVENS**

Porto Alegre

2022

Nícolas Manzke Glänzel

**ESTUDO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA NEUROFISIOPATOLOGIA DA
DEFICIÊNCIA DA SULFITO OXIDASE EM RATOS NEONATOS E JOVENS**

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

Orientador: Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Glänzel, Nicolas
ESTUDO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA
NEUROFISIOPATOLOGIA DA DEFICIÊNCIA DA SULFITO OXIDASE
EM RATOS NEONATOS E JOVENS / Nicolas Glänzel. -- 2023.
122 f.
Orientador: Guilhian Leipnitz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Deficiência da sulfito oxidase. 2. Sulfito. 3.
Tiosulfato. 4. Cérebro. 5. JP4-039. I. Leipnitz,
Guilhian, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família, meus pais e irmão. Toda conquista minha tem uma grande parte de vocês. Obrigado pela educação, pelo exemplo, pelos conselhos, pelo incentivo à curiosidade, ao pensamento crítico, pelo apoio, pelo suporte.

À Bibiana, por todo amor, carinho, compreensão e companheirismo. Por dividir os momentos felizes e pelo apoio nos momentos mais difíceis. Tenho muito orgulho de dividir a vida contigo e com o Chico.

Ao meu orientador, Guilhian, por te me recebido e aceitado me orientar, ainda como aluno de mestrado, mesmo sem me conhecer. Obrigado por todo incentivo, pela paciência, pelos ensinamentos, pela amizade e por todas as orientações nesses últimos anos.

Aos meus colegas de laboratório, em especial os colegas do antigo “Laboratório “27”, pela parceria, por toda ajuda e por tudo que aprendi com vocês, como colegas, como amigos. Desejo muito sucesso a todos. Aos colegas que ingressaram no Lab mais recentemente, agradeço enormemente por toda ajuda neste último período de Doutorado, foi essencial.

Agradeço aos amigos que fiz nestes anos de mestrado e doutorado no Departamento de Bioquímica, que foram e são essenciais em todos os momentos. Certamente o maior presente que levo deste período.

A todos os amigos que, mesmo longe fisicamente, levo sempre perto. Obrigado por todos os abraços, palavras, carinhos, conselhos, apoio. Tenho muito orgulho da amizade de todos fico muito feliz em poder compartilhar a vida com vocês.

A todos os funcionários do Departamento, por toda ajuda, atenção, dedicação e esforço. Deixo aqui um agradecimento especial ao Giordano (que inclusive tenho orgulho de registrar que já foi assador no meu aniversário), por toda ajuda e disponibilidade nesses anos.

À UFRGS, pública, gratuita e de qualidade, por fornecer acesso ao conhecimento, ótimos professores, funcionários e uma estrutura que me permitiram não só aprender, como desenvolver a minha pesquisa.

A todos aqueles que, de alguma forma, participaram da minha vida. Vocês fazem parte deste caminho até aqui.

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
I.1. INTRODUÇÃO	7
I.1.1. Catabolismo dos aminoácidos sulfurados.....	7
I.1.2. Sulfito Oxidase.....	9
I.1.3. Deficiência da sulfito oxidase (SO).....	12
I.1.4. Achados laboratoriais	13
I.1.5. Sintomas e neuropatologia	15
I.1.6. Tratamento	16
I.1.7. Fisiopatologia.....	17
I.1.8. Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes	19
I.1.9. Apoptose.....	21
I.1.10. JP4-039	24
I.2. OBJETIVOS	27
PARTE II	29
Capítulo I.....	30
Capítulo II.....	42
PARTE III	55
III.1. DISCUSSÃO	56
III.2. CONCLUSÕES	67
III.3. PERSPECTIVAS.....	69

REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO I	78

PARTE I

Introdução e Objetivos

RESUMO

A deficiência da sulfito oxidase (SO) é uma condição de caráter autossômico recessivo que pode ser encontrada em duas formas: deficiência isolada da SO e deficiência do cofator molibdênio. A deficiência isolada da SO ocorre devido a mutações no gene *SUOX*, responsável por codificar a apoenzima da SO propriamente dita, levando à diminuição ou ausência de atividade, e posterior degradação da enzima. Já a segunda forma é causada pela deficiência na atividade de alguma das enzimas que participam da rota de biossíntese do cofator molibdênio. Visto que a enzima SO é responsável pela oxidação de sulfito a sulfato, ambas as formas são caracterizadas pelo acúmulo tecidual de sulfito e tiosulfato. Além disso, são clinicamente caracterizadas por convulsões neonatais graves, disfunção neurológica progressiva, hipotonia axial, hipertonicidade periférica e atraso no desenvolvimento psicomotor, o que comumente resulta em morte prematura. Considerando que a fisiopatologia do dano neurológico observado na deficiência da SO não está totalmente estabelecida, no primeiro capítulo desta tese foram investigados os efeitos *in vivo* do sulfito em estriado de ratos jovens sobre defesas antioxidantes, atividade da creatina cinase (CK), via das MAPK, e marcadores de apoptose. Também foi avaliada a influência do sequestrador de espécies reativas direcionado à mitocôndria JP4-039 sobre os efeitos tóxicos do sulfito. Para isso, ratos de 30 dias de vida receberam uma única dose intraestriatal de sulfito (Na_2SO_3 ; $2\mu\text{mol}$; grupo teste) ou NaCl ($2\mu\text{mol}$; grupo controle), sendo eutanasiados 30 min após a injeção. Em outros grupos, os ratos receberam duas injeções intraperitoneais de JP4-039 (uma injeção de $3,5\mu\text{g/g}$ e outra de $5\mu\text{g/g}$ ou duas injeções de $5\mu\text{g/g}$), 24 e 2 horas antes da administração de sulfito ou NaCl. Após a eutanásia, o estriado foi removido e homogeneizado para as análises. O sulfito diminuiu as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) e as atividades das enzimas glutathiona peroxidase (GPx), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutathiona redutase (GR), glutathiona S-transferase (GST) e CK no estriado de ratos. O sulfito ainda aumentou o conteúdo proteico das enzimas superóxido dismutase-1 (SOD1) e catalase (CAT) e diminuiu o conteúdo da heme oxigenase-1 (HO1). Além disso, o sulfito diminuiu a fosforilação da p38 e aumentou a da ERK 1/2, não tendo efeito sobre a fosforilação da JNK. Em relação à sinalização de apoptose, o sulfito aumentou o conteúdo proteico da GSK-3 β e da caspase-3 clivada. Por outro lado, o conteúdo da caspase-9, Bcl-xL e α -sinucleína não foi alterado. O pré-tratamento com o JP4-039 preveniu a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes e da CK. O JP4-039 também preveniu as alterações no conteúdo proteico da SOD1, CAT, HO1 e GSK-3 β , assim como na fosforilação da p38 e ERK 1/2 e conteúdo da caspase-3. No segundo capítulo desta tese, investigamos os efeitos do tiosulfato, outro metabólito acumulado nas doenças com deficiência da SO, sobre parâmetros de homeostase redox e metabolismo energético em córtex cerebral e cerebelo de ratos neonatos. Para isso, ratos Wistar de 1 dia receberam, através de injeção intracerebroventricular, tiosulfato ($0,5\mu\text{mol/g}$) ou PBS (veículo), sendo eutanasiados 30 minutos após a administração. Em córtex, o tiosulfato diminuiu as concentrações de GSH e a atividade das enzimas SOD, GST e CAT. Além disso, o metabólito aumentou a oxidação de DCFH. Em relação aos parâmetros de metabolismo energético, o tiosulfato reduziu a atividade do complexo II da cadeia transportadora de elétrons. Já em cerebelo, o tiosulfato, reduziu a atividade da enzima SOD e aumentou a atividade das enzimas GST e CAT. Além disso,

aumentou o conteúdo de sulfidrilas e, assim como em córtex, de oxidação de DCFH. O tiosulfato também causou redução da atividade da enzima CK em cerebelo. Desta forma, pode ser presumido que o acúmulo tanto de sulfito como de tiosulfato tem importante papel na fisiopatologia da deficiência da SO uma vez que altas concentrações destes metabólitos induzem estresse oxidativo e disfunção energética além de, no caso do sulfito, causar morte celular. Ainda, foi visto que o JP4-039 pode ser uma importante alternativa terapêutica para melhorar o prognóstico dos pacientes portadores desse distúrbio.

Palavras-chave: Deficiência da sulfito oxidase, sulfito, tiosulfato, cérebro, JP4-039.

ABSTRACT

Sulfite oxidase (SO) deficiency is an autosomal recessive condition that can manifest in two forms: isolated SO deficiency and molybdenum cofactor deficiency. Isolated SO deficiency occurs due to mutations in the *SUOX* gene, responsible for encoding the SO apoenzyme itself, leading to the decrease or absence of this activity, and subsequent degradation of the enzyme. The second form is caused by a deficiency in the activity of any enzyme that participates in the molybdenum cofactor biosynthesis route. Since the SO enzyme is responsible for the oxidation of sulfite to sulfate, both forms are characterized by tissue accumulation of sulfite and thiosulphate. Furthermore, they are clinically characterized by severe neonatal seizures, progressive neurological dysfunction, axial hypotonia, peripheral hypertonicity and psychomotor development delay, which commonly result in premature death. Considering that the pathophysiology of the neurological damage observed in SO deficiency is not fully established, the first chapter of this thesis investigated the *in vivo* effects of sulfite on antioxidant defenses, creatine kinase (CK) activity, MAPK pathway, and apoptosis markers in the striatum of young rats. The influence of the mitochondria-targeted reactive species scavenger JP4-039 was also evaluated on the possible toxic effects of sulfite. For this, 30-day-old rats received a single intrastriatal dose of sulfite (Na_2SO_3 ; $2\mu\text{mol}$; test group) or NaCl ($2\mu\text{mol}$; control group), and were euthanized 30 min after the injection. In other groups, rats received two intraperitoneal injections of JP4-039 (one injection of $3.5\mu\text{g/g}$ and another of $5\mu\text{g/g}$ or two injections of $5\mu\text{g/g}$), 24 and 2 hours before the administration of sulfite or NaCl. After euthanasia, the striatum was removed and homogenized for analysis. Sulfite decreased the concentrations of reduced glutathione (GSH) and the activities of the enzymes glutathione peroxidase (GPx), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and CK in rat striatum. Sulfite also increased the protein content of the enzymes superoxide dismutase-1 (SOD1) and catalase (CAT) and decreased the content of heme oxygenase-1 (HO1). Furthermore, sulfite decreased p38 phosphorylation and increased that of ERK 1/2, with no effect on JNK phosphorylation. Regarding apoptosis signaling, sulfite increased the protein content of GSK-3 β and cleaved caspase-3. On the other hand, the content of caspase-9, Bcl-xL and α -synuclein was not altered. Pre-treatment with JP4-039 prevented the decrease in the activity of antioxidant enzymes and CK. JP4-039 also prevented changes in SOD1, CAT, HO1 and GSK-3 β protein content, as well as p38 and ERK 1/2 phosphorylation and caspase-3 content. In the second chapter of this thesis, we investigated the effects of thiosulphate, another metabolite accumulated in SO deficiency disorders, on parameters of redox homeostasis and energy metabolism in the cerebral cortex and cerebellum of newborn rats. For this, 1-day-old Wistar rats received, through intracerebroventricular injection, thiosulfate ($0.5\mu\text{mol/g}$) or vehicle, and were euthanized 30 minutes after administration. In the cortex, thiosulphate decreased GSH concentrations and SOD, GST and CAT activities. Furthermore, it increased the oxidation of DCFH. Regarding the bioenergetics parameters, thiosulphate reduced the activity of the respiratory chain complex II. In the cerebellum, thiosulphate reduced the activity of SOD and increased the activity of GST and CAT. In addition, it increased the content of sulfhydryl groups and the oxidation of DCFH. Thiosulphate also caused a decrease in CK activity. Thus, it can be presumed that the accumulation of both sulfite and thiosulphate plays an important role in the pathophysiology of symptoms observed in SO deficiency, since

high concentrations of these metabolites can exacerbate oxidative stress and cause energetic failure and, as seen with sulfite, cause cell death. In addition, we suggest that JP4-039 can be an important therapeutic alternative to improve the prognosis of patients with these disorders.

Keywords: Sulfite oxidase deficiency, sulfite, thiosulphate, brain, JP4-039.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-MST - 3-mercaptopiruvato sulfotransferase
AAT - aspartato aminotransferase
APAF1 - peptidase apoptótica da molécula adaptadora 1
CAT - catalase
CBS - cistationina β -sintase
CDO - cisteína dioxygenase
CK - creatina cinase
cPMP - monofosfato de piranopterinina cíclico
CSE - γ -cistationase
CT - cisteína aminotransferase
DCFH - 2',7'-diclorofluorescina
EIM - erros inatos do metabolismo
ERO - espécies reativas de oxigênio
ETHE1 - encefalopatia etilmalônica 1
G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH - glutamato desidrogenase
GFAP - proteína fibrilar glial ácida
GPx - glutationala peroxidase
GR - glutationala redutase
GSH - glutationala reduzida
GSS⁻ - persulfeto
GSSG - glutationala oxidada
GST - glutationala S-transferase
HO-1 - heme oxigenase-1
ISOD - deficiência isolada da sulfito oxidase
MAPK - proteínas cinases ativadas por mitógenos
MEL - melatonina
MoCD - deficiência do cofator molibdênio
MoCo - cofator molibdênio
MOCS1 - proteína de síntese do cofator molibdênio 1
MPT - transição da permeabilidade mitocondrial
RE - retículo endoplasmático
SDH - succinato desidrogenase
SNC - sistema nervoso central
SO - sulfito oxidase
SOD - superóxido dismutase
TST - tiosulfato enxofre transferase

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Catabolismo dos aminoácidos sulfurados

A metionina e a cisteína são os principais aminoácidos sulfurados, uma vez que são dois dos 20 aminoácidos canônicos que são incorporados às proteínas durante a síntese. No entanto, a taurina e homocisteína também possuem papéis fisiológicos bastante importantes, como anticonvulsivos, termorreguladores, manutenção da função cerebelar, reações de metilação, entre outros (HUXTABLE, 1992; KAPLAN et al., 2020; LEVINE et al., 1996).

O catabolismo dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína leva à formação de sulfeto de hidrogênio (H_2S) e sulfito, que são posteriormente degradados na mitocôndria (Figura 1). A metionina é catabolizada à cisteína através de uma via de transmetilação e transulfuração contendo as enzimas cistationina β -sintase e γ -cistationase, que controlam o fluxo do enxofre entre seus intermediários homocisteína, cistationina e cisteína. O catabolismo da cisteína, por sua vez, pode ocorrer através de duas vias, a não oxidativa e a oxidativa. Na primeira, ocorre formação de sulfeto de hidrogênio através tanto da atividade das enzimas cistationina β -sintase (CBS) e γ -cistationase (CSE), com a conjugação da cisteína e da homocisteína, como através de uma via que envolve as enzimas cisteína aminotransferase (CT) e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3-MST). Na mitocôndria, o sulfeto de hidrogênio é oxidado através da ação da enzima sulfeto quinona oxirredutase, gerando o enxofre sulfano que, por sua vez, é conjugado ao sulfito, formando o tiosulfato. A partir de uma reação catalisada pela tiosulfato enxofre transferase (TST), o tiosulfato pode ser convertido a sulfito, utilizando uma

molécula de GSH e formando um persulfeto (GSS^-), que pode também se convertido a sulfito através da atividade proteína da encefalopatia etilmalônica 1 (ETHE1), uma enxofre dioxigenase. O sulfito poderá então ser conjugado ao sulfeto de hidrogênio para formar tiosulfato, ou ainda ser oxidado pela sulfito oxidase (SO), uma enzima dependente do cofator molibdênio (MoCo). Deve ser destacado que o MoCo é sintetizado a partir do GTP em uma via de quatro etapas (DI MEO; LAMPERTI; TIRANTI, 2015; JACKSON; MELIDEO; JORNS, 2012; SCHWARZ; MENDEL; RIBBE, 2009; VISCOMI et al., 2010).

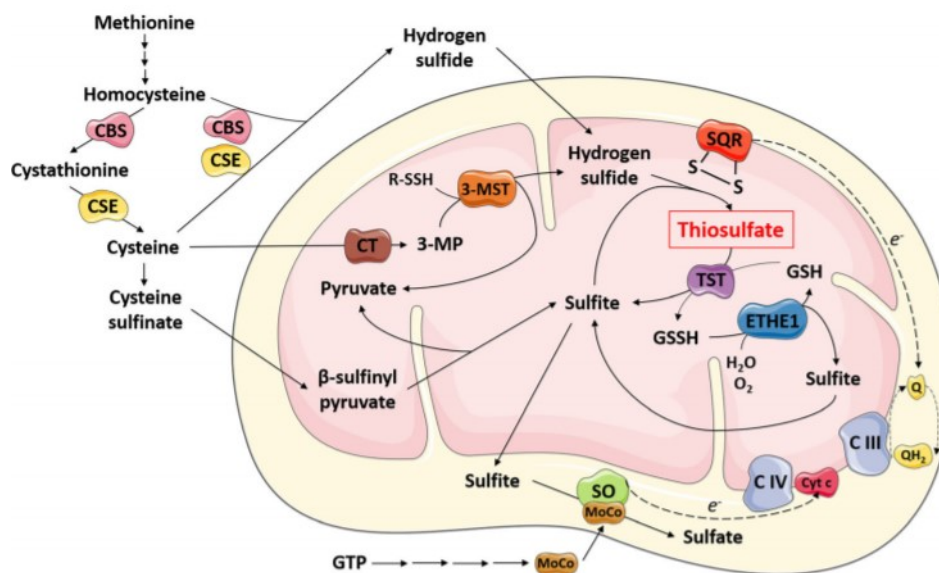


Figura 1. Via não-oxidativa do catabolismo dos aminoácidos metionina e cisteína. Adaptado de Grings et al. (2018).

Já na via oxidativa do catabolismo da cisteína, a enzima cisteína dioxigenase (CDO) oxida a cisteína a cisteína-sulfinato, sendo então convertida a sulfinil-piruvato através de uma reação catalisada pela aspartato aminotransferase (AAT). O sulfinil-piruvato é então, na mitocôndria, degradado a piruvato e sulfite, que será também oxidado pela enzima sulfito oxidase (SO) a sulfato (DI MEO; LAMPERTI; TIRANTI,

2015; JACKSON; MELIDEO; JORNS, 2012; SCHWARZ; MENDEL; RIBBE, 2009; VISCOMI et al., 2010).

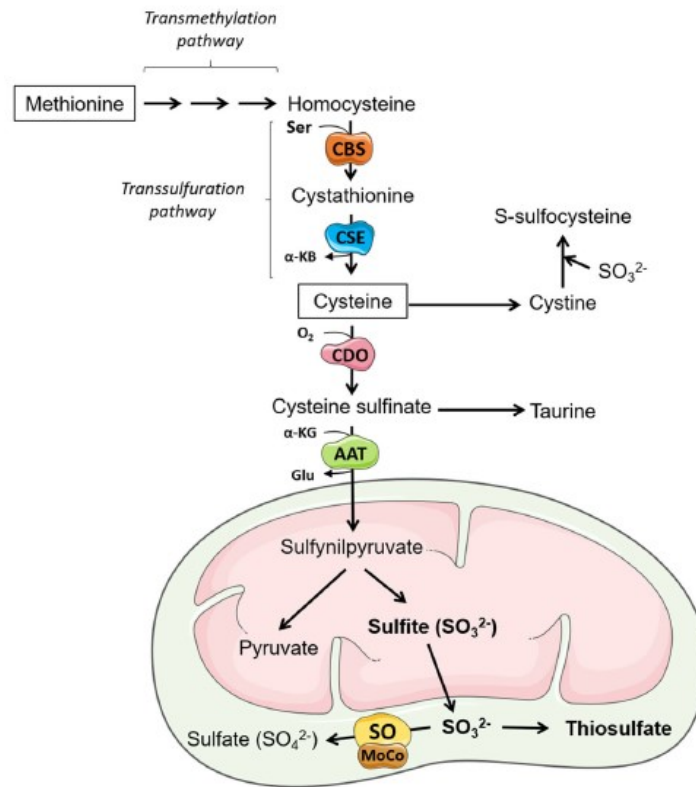


Figura 2. Via oxidativa do catabolismo dos aminoácidos metionina e cisteína. Adaptado de Wyse et al. (2019).

I.1.2. Sulfito Oxidase

A enzima mitocondrial sulfito oxidase (SO) (EC 1.8.3.1), localizada no espaço intermembranas, catalisa a oxidação de sulfite a sulfato, a última etapa na via de degradação dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína (HOBSON et al., 2005; JOHNSON, 2003). Além disso, enzima também detoxifica o sulfite de origem exógena, uma vez que esse composto e seus derivados são amplamente utilizados

na indústria farmacêutica a fim de manter a estabilidade de certos medicamentos assim como em conservantes alimentares (GARRETT; RAJAGOPALAN, 1996). A enzima possui a estrutura de um homodímero com massa molecular de aproximadamente 110 kDa, sendo que cada monômero possui três domínios: o domínio heme citocromo b5, um domínio de ligação do cofator molibdênio e um domínio C-terminal, sendo este responsável por sua dimerização (KISKER et al., 1997). A ação da SO é responsável por manter os níveis plasmáticos de sulfito em até 10 μ M (JI; SAVON; JACOBSEN, 1995).

O MoCo consiste em um grupo prostético de baixo peso molecular, no qual um átomo de molibdênio se encontra complexado a uma pterina. O molibdênio é responsável pela oxidação do sulfito, que ocorre através da redução do molibdênio (VI) para o molibdênio (IV). Os elétrons provenientes do sulfito são então transferidos, um de cada vez, através do heme b5 da enzima para o citocromo c (Johnson and Duran, 2001).

Uma vez que o organismo é incapaz de reciclar o MoCo e seus precursores, o organismo necessita sintetizar o cofator *de novo*, o que ocorre através de uma via biossintética altamente conservada que pode ser dividida em três etapas principais (Figura 3), tendo uma molécula de GTP como substrato inicial. A primeira etapa consiste na formação do monofosfato de piranopterina cíclico (cPMP); na segunda, ocorre a formação d pterina de ligação a metal (MPT); na terceira, há a inserção do molibdênio na molibdopterina para formar o MoCo (MENDEL; LEIMKÜHLER, 2015; SCHWARZ, 2016; SCHWARZ; BELAIDI, 2013).

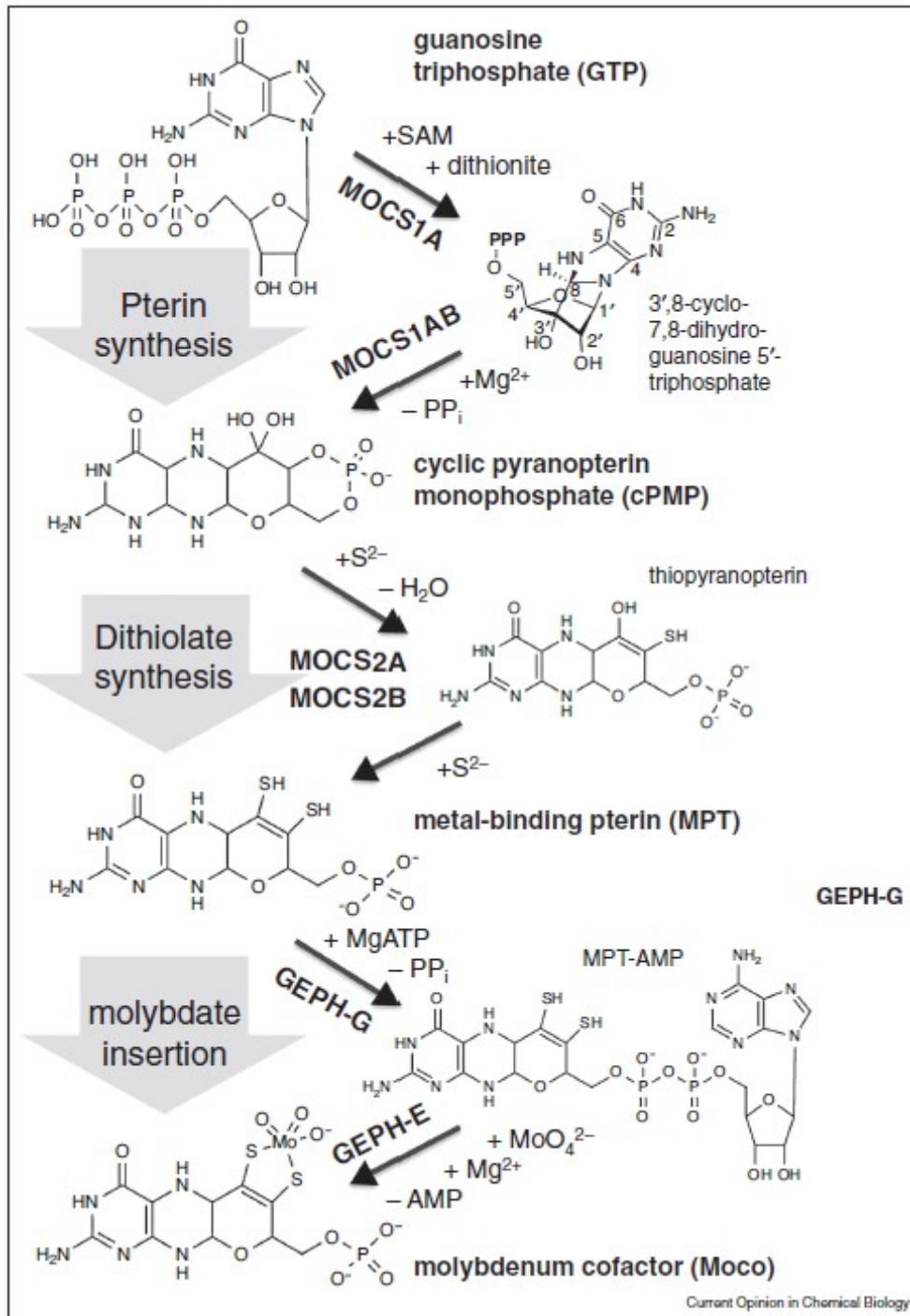


Figura 3. Biossíntese do cofator molibdênio (MoCo). Adaptado de Schwarz (2016).

I.1.3. Deficiência da sulfito oxidase (SO)

A deficiência da SO é uma condição de caráter autossômico recessivo, podendo se manifestar sob duas formas. A primeira é causada pela deficiência isolada da enzima SO (ISOD), enquanto a segunda por uma deficiência na rota de biossíntese do MoCo (MoCD). A deficiência isolada da SO ocorre devido a mutações no gene *SUOX*, responsável por codificar a apoenzima SO, o que leva a uma síntese de uma proteína defeituosa com pouca ou nenhuma atividade enzimática, sendo posteriormente degradada. Até o momento, foram reportados aproximadamente 50 casos de ISOD e 30 variantes do gene *SUOX* (LI et al., 2022). Há relatos da manifestação da ISOD tanto na forma moderada como na severa; no entanto, o fenótipo moderado é relativamente raro neste caso, manifestando-se geralmente nos primeiros dias de vida (LI et al., 2022).

Já a deficiência do MoCo é decorrente de mutações em um dos genes que codificam as enzimas envolvidas na rota de biossíntese do MoCo. Até o momento, já foram descritos aproximadamente 100 casos de pacientes com MoCD, com relatos de mutações nos genes *MOCS1*, *MOCS2*, *MOCS3* e *GPHN*, sendo a patologia classificada como MoCD do tipo A, B (*MOCS2* e *MOCS3*) ou C, respectivamente (Figura 4) (SPIEGEL et al., 2022). A deficiência do MoCo prejudica não apenas a atividade da SO, mas também da xantina desidrogenase e aldeído oxidase, já que essas enzimas também necessitam do MoCo (EDWARDS et al., 1999; SASS et al., 2010; TAN et al., 2005). No entanto, já foi relatado que os pacientes tanto com a deficiência combinada da xantina oxidase e da aldeído oxidase, como aqueles com a deficiência isolada destas enzimas, são assintomáticos, o que indica que os

sintomas neurológicos graves apresentados nesta forma da doença se devem devido à ausência de atividade da SO (JOHNSON; DURAN, 2001).

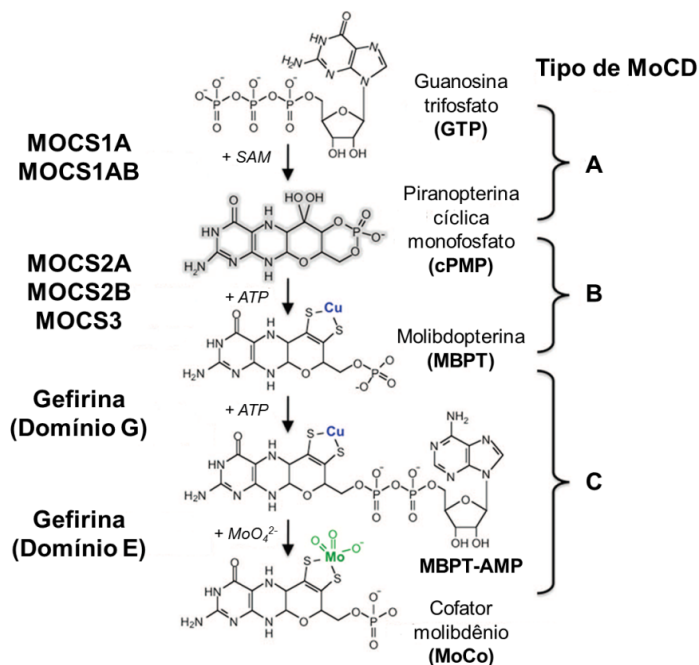


Figura 4. Via de biossíntese do cofator molibdênio (MoCo). Adaptado de Veldman et al. (2010).

I.1.4. Achados laboratoriais

De maneira geral, os achados laboratoriais de pacientes com ISOD incluem: teste positivo para sulfito na urina, aumento dos níveis urinários de S-sulfocisteína, taurina e tiosulfato, aumento dos níveis plasmáticos de S-sulfocisteína e taurina, níveis urinários e plasmáticos de ácido úrico e metionina, e níveis plasmáticos reduzidos de cisteína e homocisteína (BINDU et al., 1993; ROCHA et al., 2014). No caso da deficiência do cofator molibdênio, os pacientes apresentam ainda aumento dos níveis urinários de xantina e hipoxantina, assim como redução dos níveis

plasmáticos de ácido úrico devido à deficiência da atividade da enzima xantina oxidase. A análise dos níveis de xantina e hipoxantina é utilizado para diferenciar a ISOD da deficiência do MoCo (Figura 5) (JOHNSON; DURAN, 2001; SASS et al., 2010).

Em relação ao teste urinário para detecção de sulfito, este é bastante instável, de forma que desaparece rapidamente da urina à temperatura ambiente devido à sua auto-oxidação, devendo o teste ser realizado rapidamente após a coleta. Além disso, testes falso-positivos de para sulfito na urina podem ocorrer devido à utilização de medicamentos contendo grupos sulfidrilas alifáticos livres, certos antibióticos e degradação bacteriana da amostra (BINDU et al., 1993; JOHNSON; DURAN, 2001; TAN et al., 2005).

O aumento dos níveis de lactato, um indicativo de disfunção mitocondrial, é corroborado por estudos que indicam que o sulfito prejudica a bioenergética mitocondrial em cérebros de ratos (GRINGS et al., 2013, 2014; ROSSIGNOL; FRYE, 2012). Já o aumento nos níveis urinários e plasmáticos de taurina é devido ao aumento na degradação do sulfinato de cisteína (WYSE et al., 2019).

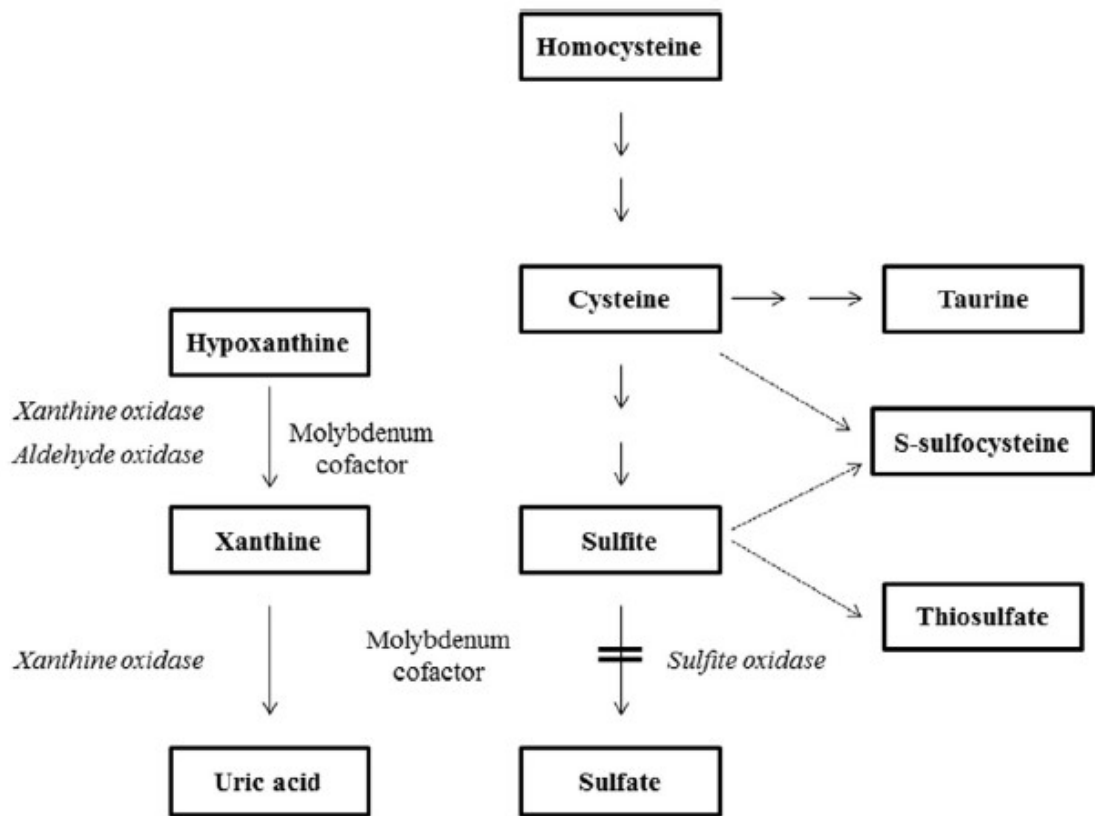


Figura 5. Via metabólica da cisteína e da xantina. Adaptado de Rocha et al. (2014).

I.1.5. Sintomas e neuropatologia

A ISOD e a MoCD apresentam sintomas e achados neuropatológicos similares, sendo indistinguível a manifestação clínica das duas formas da deficiência da SO (SPIEGEL et al., 2022). Ambas as formas são clinicamente caracterizadas por disfunção neurológica grave e progressiva, convulsões neonatais, hipotonia axial, hipertonicidade periférica, além de subluxação do cristalino e atraso no desenvolvimento, resultando geralmente em morte prematura (CHAN et al., 2002; EDWARDS et al., 1999; JOHNSON; DURAN, 2001). Bioquimicamente, os pacientes afetados por ambas doenças apresentam acúmulo de sulfite e tiosulfato nos

tecidos e líquidos corporais (BASHEER et al., 2007; HERKEN et al., 2009). Os achados neuropatológicos incluem encefalopatia grave com perda massiva de neurônios e desmielinização na substância branca cerebral acompanhada de gliose e espongiose difusa. Atrofia cortical grave, dilatação dos ventrículos e anormalidades nos gânglios basais, bem como perda de mielina no cerebelo também já foram evidenciadas (CHEN; TSAI; HUANG, 2014; EDWARDS et al., 1999; TAN et al., 2005; VIJAYAKUMAR et al., 2011). Além disso, exames de ressonância magnética mostram hipoplasia do corpo caloso, gânglios basais e tronco cerebral, e alterações císticas e calcificações nos gânglios basais (BINDU et al., 2011; HOLDER et al., 2014; TAN et al., 2005).

I.1.6. Tratamento

O tratamento para ambas as formas da deficiência da SO é bastante limitado. O tratamento sintomático é geralmente realizado com o objetivo de controlar as convulsões, porém apresenta pouco sucesso (SASS et al., 2010). Em alguns pacientes com deficiência moderada da atividade da SO (fenótipo moderado da ISOD), uma dieta com baixa quantidade de proteína e teor reduzido de aminoácidos sulfurados também é utilizada, causando diminuição dos níveis de tiosulfato e S-sulfocisteína na urina e melhorias no desenvolvimento psicomotor (TOUATI et al., 2000). Um tratamento para pacientes com a deficiência do MoCo causada por mutações no gene *MOCS1*, que é chamada de deficiência de MoCo tipo A, foi proposto por Veldman et al. (2010). Ele consiste na terapia de substituição com piranopterina monofosfato cíclica (cPMP), um intermediário da via biossintética do MoCO, através de administração intravenosa. Os biomarcadores urinários da

doença (S-sulfocisteína, xantina e urato) retornaram a níveis quase normais em todos os pacientes tratados com cPMP, e grande parte dos pacientes apresentou uma melhora clínica, com total supressão ou redução das convulsões (SCHWAHN et al., 2015). No entanto, esse tratamento não é eficiente para pacientes com a ISOD, que apresentam síntese normal de MoCo, e nem para pacientes com outros tipos de deficiência do MoCo, uma vez que esses apresentam um bloqueio enzimático na via de biossíntese do MoCo posterior à síntese de cPMP. Portanto, é importante o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas que sejam benéficas para todos os fenótipos da deficiência da SO.

I.1.7. Fisiopatologia

Apesar de os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na disfunção neurológica na ISOD e MoCD não estarem totalmente estabelecidos, estudos mostram que o sulfito é um metabólito neurotóxico. Já foi demonstrado que o sulfito pode sofrer auto-oxidação gerando radicais livres (ABEDINZADEH, 2001; BAKER; DEHRING; GREGERSON, 2002; HAYON; TREININ; WILF, 1972), e induzir estresse oxidativo *in vitro* em cérebro e hepatócitos de ratos (DERIN et al., 2009; GRINGS et al., 2013). Em estudos com ratos deficientes para a SO, foi verificado que concentrações aumentadas de sulfito induzem lipoperoxidação no hipocampo e diminuem a capacidade antioxidante do plasma, além de causarem déficit cognitivo (HERKEN et al., 2009; KÜÇÜKATAY et al., 2006). Zhang e colaboradores (2004) observaram que o sulfito diminui a biossíntese de ATP e o potencial de membrana mitocondrial, e inibe a atividade da glutamato desidrogenase em mitocôndrias de cérebro de ratos.

Além disso, achados *in vitro* de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o sulfito altera o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória e diminui o consumo de oxigênio em cérebro de ratos normais (DE MOURA ALVORCEM et al., 2017; GRINGS et al., 2014). O sulfito também induz a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial na presença de Ca^{2+} , resultando na liberação de citocromo c da mitocôndria (GRINGS et al., 2014), inibe a atividade da creatina cinase (CK) e causa morte neuronal (DE MOURA ALVORCEM et al., 2017; KUMAR et al., 2017; PARMEGGIANI et al., 2015). Nosso grupo ainda evidenciou que a administração intraestriatal de sulfito induz estresse oxidativo, e causa disfunção mitocondrial, reatividade glial e morte neuronal em estriado de ratos (GRINGS et al., 2017). Um estudo recente, utilizando camundongos *knockout* para o gene *SUOX* (MELLIS et al., 2021), verificou que o sulfito reduziu a viabilidade celular e a produção de ATP em fibroblastos. Além disso, a partir do tratamento de fibroblastos humanos com baixas concentrações de sulfito (40 μ M), verificou-se que as mitocôndrias estavam hiperfundidas, o que indica uma resposta a um estresse mitocondrial leve. No entanto, a utilização de uma dose maior (50 μ M), levou à fragmentação mitocondrial, indicando um dano grave demais para ser reparado (MELLIS et al., 2021).

Enquanto vários estudos já demonstraram os efeitos causados pelo acúmulo de sulfito no organismo, poucos estudos *in vitro* foram realizados para investigar os potenciais efeitos tóxicos do tiosulfato, outro metabólito acumulado em ambas as formas da deficiência da SO, e suas contribuições para as anormalidades cerebrais encontradas nos pacientes. Contudo, já foi mostrado que o tiosulfato diminuiu a atividade das enzimas CK e citrato sintase, e aumentou a atividade da enzima CAT em estriado de ratos de 30 dias (GRINGS et al., 2018). Além disso, o tiosulfato

diminuiu a atividade do complexo IV e aumentou o dano oxidativo, verificado através do aumento da oxidação da 2',7'-diclorofluorescina e produção de peróxidos em cérebro de ratos (GRINGS et al., 2013).

I.1.8. Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes

Existem diversas definições para “radicais livres”, no entanto, uma simples e bem aceita é a de que um radical livre é qualquer espécie capaz de uma existência independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular, tendendo a perder ou receber um elétron de outra molécula a fim de se tornar mais estável (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015a).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) é um termo utilizados para espécies derivadas do O_2 que são mais reativas que o próprio O_2 , que por si só já é um radical livre contendo dois elétrons desemparelhados. As ERO incluem não só o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), como também outros derivados não radicais do O_2 , como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Desta forma, todos os radicais de oxigênio são ERO, mas nem todos as ERO são radicais de oxigênio (GILBERT, 2012; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015a). As ERO são altamente reativas e possuem a capacidade de danificar componentes como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Além disso, as alterações causadas por ERO em DNA, RNA, lipídios e estrutura de proteínas, podem resultar na produção de mais espécies reativas. Além disso, as ERO têm impacto em diversas vias de sinalização celular (DOORN; PETERSEN, 2003;

ZHANG et al., 2016). Além das ERO, são encontradas ainda espécies reativas de nitrogênio, ferro, cobre e enxofre (PISOSCHI; POP, 2015).

Uma das principais fontes *in vivo* de $O_2^{\bullet-}$ em células eucariotas aeróbicas é a cadeia transportadora mitocondrial. Enquanto as citocromo c oxidases não liberam ERO normalmente, pode haver vazamento de elétrons pelos outros complexos da cadeia transportadora de elétrons para o O_2 , gerando o ânion superóxido que, por sua vez, pode ser convertido a H_2O_2 , uma espécie reativa não-radical, pela enzima superóxido dismutase (SOD). Apesar disso, em condições fisiológicas, a maior parte dos elétrons é transferida para o próximo componente da cadeia (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015a).

Considerando os efeitos nocivos das espécies reativas, fazem-se necessários mecanismos de defesa, as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, que podem tanto ser produzidos pelo organismo como obtidos do ambiente através da dieta. As defesas antioxidantes incluem: agentes que removem cataliticamente as espécies reativas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); agentes que controlam a formação de espécies reativas, que incluem proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes como íons de ferro, cobre ou heme. São exemplos: transferrinas, heme oxigenases, albumina, entre outras; agentes que preferencialmente reagem com espécies reativas e, assim, impedem que elas causem dano a outras importantes biomoléculas. São exemplos a glutathione reduzida (GSH), α -tocoferol, ácido ascórbico, albumina, entre outros; além de outros compostos e proteínas que protegem biomoléculas de sofrerem danos através de outros mecanismos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015a).

Em situações fisiológicas, a produção de espécies reativas é balanceada pelas defesas antioxidantes do organismo. No entanto, quando este balanço é prejudicado, em situações patológicas, por exemplo, e a produção de espécies reativas é superior à capacidade de defesa antioxidante, tem-se um quadro denominado estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015a). O estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio entre o balanço pró-oxidante em favor da produção das espécies reativas, levando a um quadro de potencial dano. A este dano denomina-se de dano oxidativo, que pode ser definido como o dano a biomoléculas causados pelo ataque de espécies reativas a constituintes de organismos vivos. O estresse oxidativo pode ser resultado tanto da redução dos níveis de antioxidantes, como do aumento na produção de espécies reativas (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; SIES, 1997). As células podem tolerar até certo nível de estresse oxidativo (moderado), o que geralmente ocorre através do aumento na síntese de enzimas antioxidantes com a finalidade de neutralizar as espécies reativas produzidas. No entanto, caso o dano celular seja exacerbado, o estresse celular pode levar à morte celular por tanto por necrose, como por apoptose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015a).

I.1.9. Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular seletiva que requer o envolvimento de um programa específico de morte celular. É um processo que possui um importante papel tanto no desenvolvimento embrionário, como na manutenção da homeostase de tecidos adultos, ao eliminar células velhas, desnecessárias e

danificadas. Quando descontrolada, a apoptose está implicada em diversas doenças, inclusive neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Huntington, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica. Nestes casos, a apoptose está com sua taxa elevada. No entanto, quando a apoptose está reduzida, células que deveriam ser eliminadas podem persistir e se reproduzir, como no caso dos tumores (RADI et al., 2014).

A apoptose se caracteriza por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas, como condensação e fragmentação da cromatina nuclear e organelas citoplasmáticas, e dilatação do retículo endoplasmático (RE). As células apoptóticas, no geral, perdem contato com suas células vizinhas e encolhem formando bolhas em sua membrana que, por sua vez, são progenitores de corpos apoptóticos com fragmentos citoplasmáticos envoltos pela membrana celular. Estes corpos apoptóticos permanecem com sua membrana íntegra, prevenindo o extravasamento do material celular e, conseqüentemente, a resposta inflamatória e dano tecidual local (COHEN, 1997; ELMORE, 2007; KANNAN; JAIN, 2000). Além disso, as células apoptóticas apresentam em sua superfície diversas moléculas como lipídeos, carboidratos e proteínas, permitindo que os corpos apoptóticos sejam rapidamente reconhecidos e degradados por fagócitos ou células vizinhas (FADEEL; ORRENIUS, 2005; LAUBER et al., 2004; RAVICHANDRAN, 2011).

Enquanto as características morfológicas e bioquímicas da apoptose são similares e conservadas através das espécies, o sinal desencadeador e, conseqüentemente, a via de sinalização de apoptose ativada podem variar bastante, cada uma convergindo para uma sequência de eventos envolvendo caspases e proteínas da família Bcl-2 (KANNAN; JAIN, 2000). Entre os insultos que podem desencadear a apoptose, tem-se interferências no metabolismo energético, como a

inibição da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, estresse oxidativo e celular e dano ao DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015a).

Em relação à sinalização apoptótica, existem duas principais vias: a extrínseca e a intrínseca (ou mitocondrial) (Figura 6). Ambas convergem após a ativação das caspases 3 e 7. Como proteases, essas caspases executoras clivam centenas de proteínas diferentes levando às alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose (JULIEN; WELLS, 2017). A via extrínseca é ativada na membrana celular, através da ligação de ligantes de receptores de morte ao seu respectivo receptor, o que leva à ativação da caspase 8 que, por sua vez, propagará a apoptose ao clivar as pró-caspases 3 e 7, levando à sua ativação. Já a via mitocondrial da apoptose, que ocorre em resposta a diversos estresses celulares, como a privação de fatores de crescimento ou dano ao DNA, requer a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) para liberar proteínas solúveis do espaço intermembranoso da mitocôndria, levando à morte celular (BOCK; TAIT, 2020). Entre as proteínas que podem ser liberadas do espaço intermembranoso, o citocromo *c* se liga ao fator de ativação da peptidase apoptótica da molécula adaptadora 1 (APAF1), formando um complexo chamado apoptossomo. O apoptossomo, por sua vez, se liga e ativa a caspase 9, uma caspase iniciadora, que, subsequentemente, cliva e ativa as caspases executoras (BOCK; TAIT, 2020; DORSTYN; AKEY; KUMAR, 2018). Alguns membros das proteínas da família Bcl-2 também podem desencadear a via mitocondrial da apoptose, ao regular a permeabilidade da membrana mitocondrial externa e, desta forma, induzir a liberação dos fatores pró-apoptóticos. Essa família possui mais de 30 membros. Alguns inibem a apoptose, como a Bcl-2 e a Bcl-XL; outras promovem o processo,

como a Bax, Bak e Bad. O balanço entre estas controla a probabilidade da apoptose mediada pela mitocôndria (BOCK; TAIT, 2020).

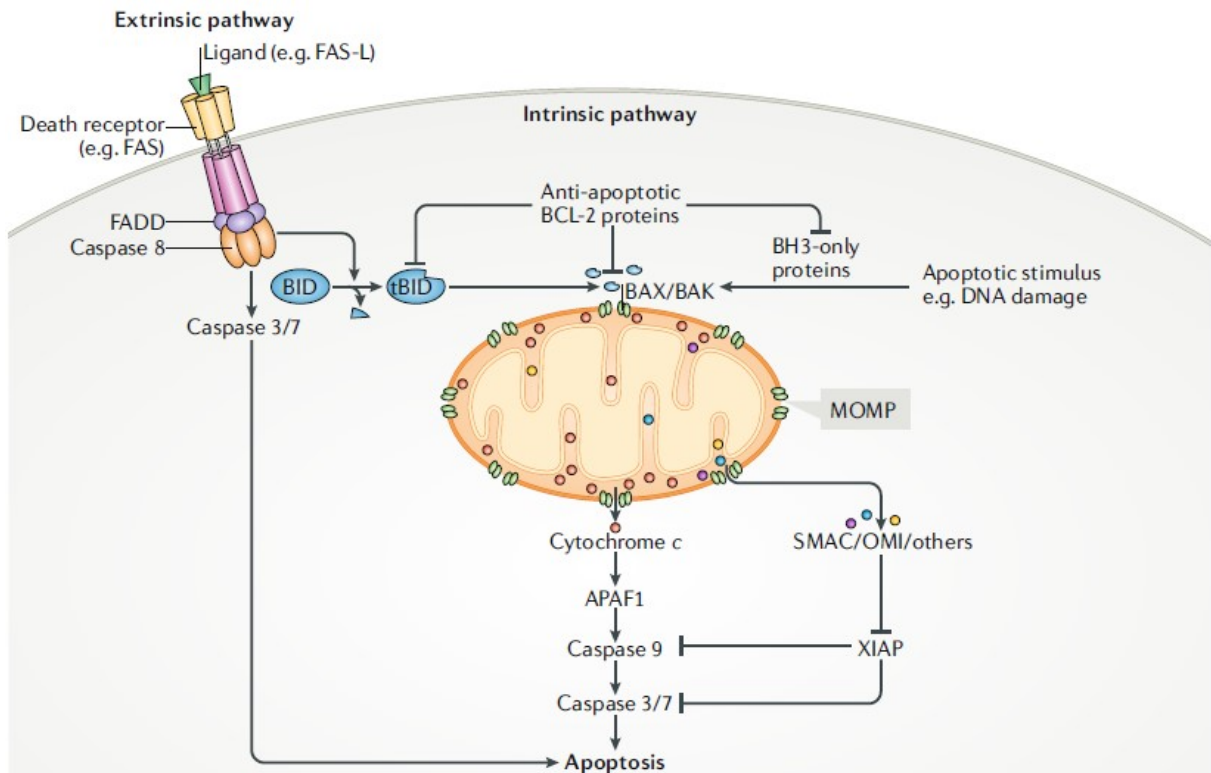


Figura 6. Vias de sinalização da apoptose. Adaptado de Bock et al. (2020).

I.1.10. JP4-039

O JP4-039 faz parte de uma nova classe de sequestradores de elétrons e ERO direcionados para a mitocôndria. A porção do JP4-039 que possui a atividade sequestradora propriamente dita é composta por um grupo nitróxido, derivado do antioxidante 4-amino-TEMPO (Figura 7) (FRANTZ et al., 2011; WIPF et al., 2005). Os grupos nitróxido diminuem os níveis de espécies reativas, particularmente de ânion superóxido, devido à sua redução pela cadeia transportadora de elétrons, gerando hidroxilamina, um sequestrador de espécies reativas (FRANTZ et al., 2011).

Já a porção da molécula de JP4-039 responsável por seu acúmulo seletivo na mitocôndria (cerca de 32 vezes mais concentrado que no citosol) é derivada do antibiótico gramicidina (FRANTZ et al., 2013), sendo permeável às membranas mitocondriais. Publicações recentes têm demonstrado que o JP4-039 previne peroxidação lipídica e apoptose, estimula a função mitocondrial e confere proteção contra danos decorrentes da exposição à radiação (BERHANE et al., 2014a, 2014b; SEMINOTTI et al., 2019; SHINDE et al., 2016).

Referente à farmacocinética do JP4-039, foi demonstrado (CHRISTNER et al., 2018) que, após administrado, via intravenosa em camundongos, o JP4-039 possui uma meia-vida plasmática relativamente curta, de até 6 horas, e uma boa distribuição nos tecidos, incluindo o cérebro. Os dados indicaram que o JP4-039 foi detectado no pulmão e intestino delgado por até 6 horas.

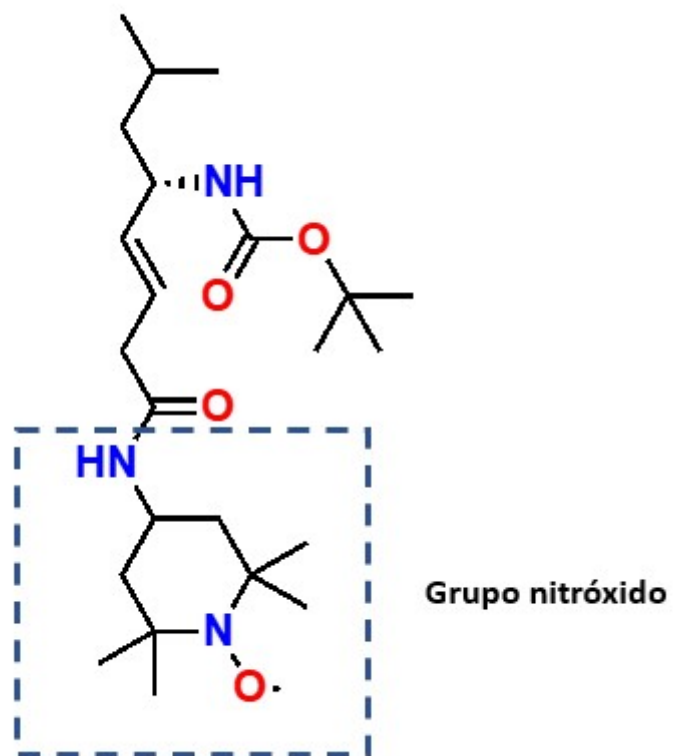


Figura 7. Molécula do JP4-039.

I.2. OBJETIVOS

Considerando que os mecanismos neurotóxicos causados pelo sulfito e pelo tiosulfato não estão totalmente estabelecidos e que a sintomatologia neurológica da deficiência da SO é devastadora, geralmente não havendo tratamento adequado, os objetivos do presente trabalho foram:

- 1) Avaliar os efeitos da injeção intraestriatal de sulfito em estriado de ratos de 30 dias de vida e do pré-tratamento com o antioxidante JP4-039, via administração intraperitoneal, sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo, transferência de energia, via das MAPK e a cascata da apoptose;
- 2) Avaliar os efeitos da injeção intracerebroventricular (ICV) de tiosulfato em córtex cerebral e cerebelo de ratos neonatos sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo, e produção e transferência de energia.

Os parâmetros estudados incluíram:

- Estresse oxidativo: atividade das enzimas antioxidantes glutationala peroxidase (GPx), glutationala redutase (GR), glutationala S-transferase (GST) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), concentrações de glutationala reduzida (GSH), oxidação da 2',7'-diclorofluorescina (DCFH) e conteúdo de heme oxigenase-1 (HO1), superóxido dismutase-1 (SOD1) e catalase (CAT).

- Produção e transferência de energia: atividade da creatina cinase (CK), succinato desidrogenase (SDH) e complexo II;

- Via das MAPK: conteúdo de p38 fosforilada e total, ERK 1/2 fosforilada e total e JNK fosforilada e total;

- Cascata da apoptose e dano celular: conteúdo de GSK-3 β , Bcl-xL, caspase-9, caspase-3, caspase-3 clivada e α -sinucleína.

PARTE II

Artigo Científico e Resultados do Estudo dos Efeitos do Tiosulfato

PARTE III

Discussão e Conclusões

III.1. DISCUSSÃO

O sulfito e o tiosulfato são metabólitos encontrados em altas concentrações tanto nos tecidos quanto nos líquidos biológicos de indivíduos afetados pela deficiência isolada da SO e pela deficiência do MoCo (JOHNSON; DURAN, 2001; OZTURK et al., 2010). Apesar de a maioria dos pacientes ter parto sem complicações após uma gestação sem intercorrências, o início dos sintomas geralmente ocorre logo após o nascimento (JOHNSON; DURAN, 2001). Ambas as formas da deficiência da SO apresentam sintomas e achados clínicos similares que incluem convulsões neonatais graves, encefalopatia progressiva, atraso psicomotor, anormalidades dos gânglios basais, dilatação dos ventrículos, atrofia do córtex cerebral e cerebelo e encefalopatia grave com perda neuronal (ABEDINZADEH, 2001; BAKER; DEHRING; GREGERSON, 2002; BINDU et al., 2011; BOSLEY et al., 2014; HIGUCHI et al., 2014; VIJAYAKUMAR et al., 2011; WESTERLINCK et al., 2014). Também são encontradas lesões multicísticas que aparecem após alguns dias de vida e resultam em atrofia de diversas regiões encefálicas, levando à microcefalia secundária progressiva (HIGUCHI et al., 2014; HOLDER et al., 2014; SCHWAHN et al., 2015). Apesar de os pacientes portadores da deficiência da SO apresentarem sintomatologia neuropatológica grave, os mecanismos fisiopatológicos ainda não estão completamente elucidados.

Desta forma, para melhor compreender a fisiopatologia dos sintomas neurológicos observados na deficiência da SO, os objetivos do presente trabalho foram o de estudar os efeitos da administração intraestriatal do sulfito sobre as defesas antioxidantes, atividade da enzima CK, vias de sinalização das MAPKs e cascata de apoptose em estriado de ratos de 30 dias (capítulo I), bem como os

efeitos da administração intracerebroventricular de tiosulfato sobre homeostase redox e metabolismo energético em córtex e cerebelo de ratos neonatos (capítulo II) a fim de melhor elucidar a fisiopatologia da deficiência da SO. Visto que o tratamento atual é ineficaz e que um considerável número de pacientes vai a óbito logo após o nascimento, também avaliamos se o composto JP4-039, um sequestrador de espécies reativas de oxigênio, poderia prevenir os efeitos tóxicos causados pelo sulfito (capítulo I).

Observamos no primeiro capítulo desta tese que a administração intraestriatal de sulfito diminuiu as atividades das enzimas GPx, GR, GST e G6PDH, assim como os níveis de GSH, no estriado dos ratos de jovens 30 minutos após a injeção, sugerindo dano às defesas antioxidantes. Esses efeitos foram provavelmente causados pelos níveis elevados de espécies reativas induzidos pelo metabólito (GRINGS et al., 2013; MOTTLEY; MASON, 1988; NETA; HUIE, 1985). Esses achados estão de acordo com um estudo anterior do nosso grupo, no qual foi mostrado que a injeção intraestriatal de sulfito diminuiu as atividades dessas mesmas enzimas antioxidantes e os níveis de GSH (GRINGS et al., 2017). Já é bem sabido que a ação dessas enzimas desempenha um papel importante no sistema antioxidante, neutralizando peróxidos e mantendo as concentrações de GSH nos níveis normais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015a). O GSH, um tiol não proteico, constitui no antioxidante mais abundante nas células e principal defesa antioxidante não-enzimática do cérebro, agindo tanto como sequestrador de espécies reativas quanto como substrato para outras enzimas antioxidantes, como a GPx e a GST (DEPONTE, 2013; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015b; LU, 2013). Uma vez que verificamos uma diminuição na atividade da enzima GR, que possui um importante papel na redução do GSSG a GSH, pode-se especular que esta redução de

atividade possa contribuir também para a diminuição da concentração do GSH que possivelmente ocorre em células de pacientes (DEPONTE, 2013; ESPINOSA-DIEZ et al., 2015). Apesar de não termos analisado mais especificamente quais espécies possivelmente tenham causado a inibição das atividades das enzimas antioxidantes, já foi reportado que o peróxido de hidrogênio e os radicais peróxil, hidroxil e superóxido podem inativar as enzimas G6PDH, GR, GST, GPx, SOD e CAT (MURAKAMI et al., 2014; NINFALI et al., 2001; PIGEOLET et al., 1990; SHEN et al., 1993). Também já foi evidenciado que a glutatona S-sulfonato, um composto originado a partir da clivagem de GSSG pelo sulfito, age como um inibidor competitivo da GST (LEUNG; POST; MENZEL, 1985). No que se refere aos efeitos do pré-tratamento com JP4-039, foi visto que essa molécula, nas doses de 3,5 e 5 µg/g, atenuou os danos deletérios do sulfito nas atividades das enzimas GPx e G6PDH. Já nas doses de 5 e 5 µg/g, o JP4-039 atenuou e preveniu completamente os efeitos do sulfito sobre a atividade das enzimas GST e G6PDH, respectivamente. O efeito protetor observado do JP4-039 sobre as atividades das enzimas antioxidantes ocorre, possivelmente, devido às suas propriedades de sequestrar espécies reativas de oxigênio, desta forma prevenindo qualquer dano estrutural às proteínas que estes possam causar. Neste contexto, estudos já demonstraram a capacidade do JP4-039 em diminuir os níveis de superóxido em fibroblastos de pacientes com deficiência da MOCS1, estando de acordo com nossos resultados (GRINGS et al., 2019). O JP4-039 ainda diminuiu os níveis de superóxido em fibroblastos com a deficiência da desidrogenase de acilas-CoA de cadeia muito longa, do complexo I e da ETHE1 (LEIPNITZ et al., 2018; SEMINOTTI et al., 2019). Além disso, estes efeitos protetores poderiam ser explicados pelo fato de o JP4-039 ser um antioxidante direcionado à mitocôndria, onde se concentra de 20 a 30 vezes

mais do que no citosol em células, contrastando com outros antioxidantes clássicos, que possuem menor penetração na mitocôndria (KELSO et al., 2001; RWIGEMA et al., 2011; SMITH et al., 2004)

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) ERK, JNK e p38 regulam a atividade de diversas enzimas, proteínas e fatores de transcrição, estando envolvidas em respostas celulares a estímulos externos, como expressão gênica, proliferação, diferenciação e apoptose (BRYK; OLEJARZ; ZAPOLSKA-DOWNAR, 2014; WADA; PENNINGER, 2004). Neste contexto, vimos que o sulfito diminuiu a fosforilação da p38 e aumentou a da ERK 1/2, enquanto nenhuma alteração na fosforilação da JNK foi observada. O JP4-039 preveniu a diminuição da fosforilação da p38 e atenuou o aumento da fosforilação da ERK1/2 causados pelo sulfito, o que novamente pode ter acontecido devido à sua propriedade de neutralizar espécies reativas de oxigênio. Isso está de acordo com o fato de que espécies reativas são capazes de modular a fosforilação das MAPKs (JALMI; SINHA, 2015; RHYU et al., 2005; SANTABÁRBARA-RUIZ et al., 2015; WANG et al., 2017; YANG et al., 2018).

O sulfito também aumentou o conteúdo proteico de CAT e SOD1 e diminuiu o conteúdo da HO-1 em estriado de ratos jovens. O aumento do conteúdo proteico da CAT pode explicar o aumento de sua atividade, como encontrado em um estudo anterior (GRINGS et al., 2017), e possivelmente é um mecanismo compensatório para eliminar os altos níveis de peróxido de hidrogênio gerados pelo sulfito e pela atividade diminuída da enzima GPx (GRINGS et al., 2013; INGLÉS et al., 2016). Já o aumento do conteúdo proteico da SOD1 pode ter ocorrido devido a uma *upregulation* desta enzima em resposta aos altos níveis do ânion superóxido que também seriam possivelmente gerados pelo sulfito na presença de oxigênio (BAKER; DEHRING; GREGERSON, 2002; GRINGS et al., 2013; MOTTLEY;

MASON, 1988). Curiosamente, um trabalho anterior do nosso grupo encontrou que o sulfito não altera a atividade da enzima SOD (GRINGS et al., 2017). Considerando que os níveis de SOD1 estão elevados, pode-se especular que o sulfito causa danos à enzima levando a um aumento compensatório em seu conteúdo, o que impede que sua atividade seja prejudicada. Por outro lado, é difícil explicar o motivo pelo qual o sulfito diminuiu os níveis da enzima HO-1. Contudo, trabalhos têm demonstrado que durante condições patológicas, elevados níveis de espécies reativas podem levar à ativação do sistema ubiquitina-proteassoma com o objetivo de degradar proteínas modificadas por oxidação (ADAMS; MAPANGA; ESSOP, 2015; BHAT; ISMAIL, 2015; CERVELLATI et al., 2015; MAPANGA et al., 2012). De forma similar ao que ocorreu com as atividades das enzimas antioxidantes, o JP4-039 também preveniu esses efeitos sobre os níveis das enzimas avaliadas.

No segundo capítulo, observamos que a administração intracerebroventricular de tiosulfato também alterou as defesas antioxidantes em cérebro de ratos neonatos. O tiosulfato reduziu as concentrações de GSH e as atividades das enzimas SOD, GST e CAT em córtex de ratos neonatos. Além disso o tiosulfato aumentou a oxidação do DCFH, indicando um aumento de espécies reativas e sugerindo, conforme descrito anteriormente, que a inibição da atividade destas enzimas ocorra via ataque oxidativo (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010). Estudos da literatura têm demonstrado que o DCFH é uma sonda inespecífica, pois diferentes espécies reativas podem oxidá-lo. O DCFH não é oxidado diretamente pelo peróxido de hidrogênio, apenas após este ser convertido a espécies mais reativas por metais redox-ativos ou por proteínas heme como o citocromo *c* ou peroxidases (MURPHY et al., 2022). Apesar de o DCFH ter sido utilizado inicialmente usado para medir as concentrações de peróxido de hidrogênio nas

células, já foi descrito que o DCFH também pode ser oxidado por superóxido. Dessa forma, pode-se especular que o tiosulfato leve ao aumento de ambas espécies reativas (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010; KRISHNA RAO et al., 1992). Já a GSH é utilizada pela enzima GST como substrato para eliminar potenciais eletrófilos pró-oxidantes, que incluem produtos de dano oxidativo, como peróxidos orgânicos. Desta forma, a diminuição da atividade da enzima GST e a redução das concentrações de GSH, juntamente com o aumento de espécies reativas evidenciado pelo aumento na oxidação do DCFH, podem levar ao acúmulo de moléculas oxidadas causando uma intensificação do quadro de estresse oxidativo (AHMED et al., 2016; DEPONTE, 2013; ESPINOSA-DIEZ et al., 2015). Em um estudo *in vitro*, Grings et al. (2013) verificaram que o tiosulfato aumentou a oxidação do DCFH em córtex de ratos Wistar de 30 dias de vida. Por outro lado, em outro estudo *in vitro* (PARMEGGIANI et al., 2015), verificou-se que o tiosulfato não alterou a atividade da enzima GST, assim como as concentrações de GSH, em fatias de córtex de ratos Wistar de 30 dias. Esses efeitos diferenciais do tiosulfato podem ser explicados pelo fato de que a permeabilidade desse metabólito é provavelmente menor nas células das fatias de córtex (DA SILVA et al., 2002).

Já em cerebelo, o tiosulfato reduziu a atividade da enzima SOD e aumentou as atividades da GST e CAT, não tendo efeito sobre as concentrações de GSH. O tiosulfato também aumentou o conteúdo de sulfidrilas e a oxidação do DCFH. Em um estudo *in vivo* (GRINGS et al., 2018), verificou-se que a administração intraestriatal de tiosulfato, em ratos Wistar de 30 dias, aumentou a atividade da enzima CAT, não tendo efeitos sobre as atividades das enzimas SOD e GST e sobre as concentrações de GSH. Neste caso, o aumento da atividade da CAT causado pelo tiosulfato, juntamente com o aumento na oxidação do DCFH, poderia

indicar um aumento na produção de espécies reativas (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015b), de forma que o aumento na atividade da enzima agiria como um mecanismo para inibir o acúmulo dessas espécies e evitar o estresse oxidativo. Com relação ao aumento nos grupos sulfidrilas, sabe-se que tanto a GSH quanto esses grupos protegem lipídeos e proteínas do dano oxidativo. Desta forma, o aumento do conteúdo de sulfidrilas foi um achado inicialmente inesperado, uma vez que houve o aumento de espécies reativas, indicado pelo aumento da oxidação do DCFH, e não houve diminuição nas concentrações de GSH. No entanto, já foi demonstrado que o sulfito, um metabólito sulfurado, poderia formar grupos tióis a partir de pontes dissulfeto em hepatócitos (ROBINSON; PASTERNAK, 1964). Desta forma, poderíamos sugerir, com bastante cautela, que o tiosulfato poderia atuar da mesma forma.

Em relação à homeostase energética, no capítulo I foi observado que o sulfito inibiu a atividade da CK em estriado de ratos jovens, enzima envolvida no transporte de fosfato de alta energia dos locais de produção do ATP na matriz mitocondrial para os locais de consumo de ATP no citosol, indicando um prejuízo no transporte e tamponamento energético (DU et al., 2013; ROSCA; HOPPEL, 2013; WENDT; SCHLATTNER; WALLIMANN, 2003). Dentre os processos que consomem energia no compartimento citosólico, destacamos a síntese de ácidos graxos e a gliconeogênese. O JP4-039 preveniu a diminuição da atividade da CK induzida pelo sulfito. Estes achados corroboram resultados *in vivo* e *in vitro* obtidos em córtex e estriado, respectivamente, demonstrando que o sulfito diminuiu a atividade da CK total via ataque oxidativo (GRINGS et al., 2013, 2017). Além disso, tem sido demonstrado que a atividade da CK cerebral diminui após exposição a agentes que promovem geração de radicais livres, o que provavelmente ocorre pela oxidação de

resíduos de cisteína que são críticos para sua atividade (ARSTALL et al., 1998; KONOREV; HOGG; KALYANARAMAN, 1998; STACHOWIAK et al., 1998; WALLIMANN et al., 1998; WENDT; SCHLATTNER; WALLIMANN, 2003; WOLOSKER; PANIZZUTTI; ENGELENDER, 1996). Nesse contexto, outro trabalho evidenciou que o ditiotreitól, um agente redutor de grupos sulfidrila, preveniu o efeito inibitório *in vitro* do sulfito sobre a CK (DE MOURA ALVORCEM et al., 2017).

Já no capítulo II, a administração de tiosulfato reduziu a atividade do complexo II da cadeia transportadora de elétrons em córtex de ratos neonatos, não tendo efeito sobre as enzimas SDH e CK. Já em cerebelo, o tiosulfato reduziu a atividade da enzima CK, não tendo efeitos sobre as atividades do complexo II e da SDH. Por outro lado, Grings et al. (2013) verificaram que o tiosulfato diminuiu a atividade da enzima CK *in vitro* em córtex cerebral de ratos Wistar de 30 dias, o que foi prevenido com a utilização dos antioxidantes melatonina e GSH. Essa diferença com relação aos nossos achados sobre atividade da CK em córtex cerebral pode ser explicada pela idade dos animais em que a atividade enzimática foi avaliada. Estudos anteriores *in vitro* do nosso grupo, utilizando ratos Wistar de 30 dias, ainda verificaram que o tiosulfato reduziu a atividade da enzima CK em outras estruturas cerebrais, incluindo hipocampo, estriado e cerebelo. Assim como foi visto em córtex (GRINGS et al., 2018), os efeitos do tiosulfato em estriado sobre a atividade da CK foram prevenidos com a utilização dos antioxidantes GSH e melatonina. Além disso, quando administrado através de uma injeção intraestriatal também em ratos de 30 dias, o tiosulfato também levou à diminuição na atividade da enzima CK em estriado. Contudo, esse mesmo estudo não encontrou alterações causados pela administração intraestriatal de tiosulfato nas atividades da enzima SDH e Complexo II (DE MOURA ALVORCEM et al., 2017; GRINGS et al., 2018). Quando analisados

em conjunto esses achados mostrando que os efeitos tóxicos do tiosulfato sobre a atividade da enzima CK em córtex, hipocampo, estriado e cerebelo foram prevenidos pela utilização dos antioxidantes GSH e melatonina, reforça-se a ideia de que estes efeitos ocorrem com o envolvimento de espécies reativas.

Além disso, deve ser considerado que em um outro estudo do nosso grupo desenvolvido por Pramio *et al.* (dados não publicados - ANEXO I) foi verificado que o sulfito reduziu as concentrações de GSH e a atividade da enzima GST em córtex cerebral de ratos neonatos, efeitos similares aos causados pelo tiosulfato encontrados neste estudo. No entanto, em relação à atividade da SOD, o sulfito teve efeito oposto, aumentando sua atividade. Além disso, nesse mesmo estudo, utilizando cultura primária de astrócitos corticais de ratos neonatos, verificou-se que o sulfito, assim como o tiosulfato em homogeneizado de córtex de ratos neonatos, aumentaram a oxidação do DCFH. Desta forma, pode-se verificar que ambos os metabólitos acumulados na deficiência da SO, sulfito e tiosulfato, levam ao aumento na produção de espécies reativas em cérebro de ratos neonatos, conforme evidenciado pelo aumento na oxidação do DCFH. Por outro lado, apesar de ambos levarem a uma diminuição nas concentrações de GSH e na atividade da enzima GST, indicando um possível efeito sinérgico envolvido na fisiopatologia da doença, a resposta na atividade da enzima SOD foi oposta.

Ainda no trabalho de Pramio *et al.* (dados não publicados), foi visto que o sulfito, assim como o tiosulfato, diminuiu a atividade do complexo II, além de levar à redução das atividades das enzimas SDH e CK. Assim, percebe-se que, similarmente ao que ocorreu nos efeitos sobre os parâmetros de estresse oxidativo, o tiosulfato e o sulfito também apresentam efeitos similares sobre alguns parâmetros de metabolismo energético, indicando um possível sinergismo na

toxicidade causada. Ao comparar os efeitos do sulfito e do tiosulfato sobre os parâmetros analisados, o sulfito apresentou um efeito potencialmente mais tóxico, o que também foi verificado em experimentos *in vitro* anteriores do nosso grupo nos quais foram utilizadas as mesmas concentrações dos dois metabólitos. Nestes estudos, o sulfito apresentou maior toxicidade em relação aos parâmetros de homeostase redox (GRINGS et al., 2013, 2014; PARMEGGIANI et al., 2015).

Ainda no capítulo I, verificamos que o sulfito também aumentou o conteúdo proteico da enzima pró-apoptótica GSK-3 β e da caspase-3 clivada, que é a forma ativa da caspase-3. Saliente-se aqui que a caspase-3 é considerada uma caspase executora (MAURER et al., 2014). Conforme demonstrado na literatura, o sulfito induz a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, levando à liberação do citocromo c que, por sua vez, se liga à molécula adaptadora fator de ativação 1 da peptidase apoptótica (APAF1), formando o complexo chamado de apoptossomo (GRINGS et al., 2014). O apoptossomo, a seguir, liga-se e ativa a caspase-9 (iniciadora), que então cliva e ativa as caspases executoras, como a caspase-3, desencadeando a via mitocondrial de apoptose (BOCK; TAIT, 2020; DORSTYN; AKEY; KUMAR, 2018). A proteína GSK-3, por sua vez, possui uma série de alvos de fosforilação, regulando diferentes processos biológicos, como a síntese de glicogênio (EMBI; RYLATT; COHEN, 2005), degradação de proteínas (ABERLE et al., 1997) e regulação de morte e sobrevivência celular, exercendo um papel pró-apoptótico na via intrínseca de apoptose (MAURER et al., 2014). Por outro lado, ao ser fosforilada por alguma cinase, como por exemplo a AKT, a GSK-3 é inativada, prevenindo a morte celular (CROSS et al., 1995). Contudo, a avaliação da fosforilação da GSK-3 β ainda será realizada para uma melhor análise e interpretação de nossos resultados.

O tratamento com JP4-039 preveniu e atenuou os efeitos do sulfito no conteúdo da GSK-3 β e caspase-3 clivada, respectivamente, sugerindo que essa molécula previne a morte celular por apoptose. Esses achados estão de acordo com o fato de que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio leva ao prejuízo do transportador do efluxo de Ca⁺², causando o acúmulo deste íon na mitocôndria e dissipação do potencial de membrana que, por sua vez, facilita a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial e causa apoptose (HURST; HOEK; SHEU, 2017; LINDBLOM et al., 2015; ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2015; SEMINOTTI et al., 2019).

Ao analisarmos os resultados obtidos a partir das injeções com o sulfito e com o tiosulfato, pode-se sugerir que ambos os metabólitos desempenham papel chave no desenvolvimento da fisiopatologia e progressão dos danos neurológicos observados nos pacientes acometidos da doença. Como as concentrações destes metabólitos ainda não foram determinadas no cérebro de pacientes, podemos considerar essa uma das principais limitações deste estudo. Apesar de não termos analisado os efeitos combinados do sulfito e tiosulfato, é possível que estes metabólitos possuam ação sinérgica e, assim, induzam à neurotoxicidade e contribuam para a sintomatologia observada na deficiência da SO.

É importante destacar ainda que os danos neurológicos e anormalidades cerebrais apresentados pelos pacientes possuem início precoce, sendo que em muitos pacientes, já podem ser observados no terceiro trimestre da gestação (ALONZO MARTÍNEZ et al., 2020; ATWAL; SCAGLIA, 2016). Neste sentido, o grau de maturação cerebral observado em um feto humano entre as semanas 23 e 32 da gestação corresponde ao de um roedor com 1 dia de vida (SEMPLE et al., 2013), o que indica que a idade em administramos o tiosulfato nos ratos corresponderia ao

período da gestação em que iniciam as anormalidades cerebrais nos pacientes. Desta forma, estes achados sugerem que a toxicidade dos metabólitos acumulados tem importante papel na fisiopatologia da ISOD e MoCD já durante a gestação.

No que se refere ao uso do pré-tratamento com o JP4-039 como possível estratégia terapêutica a fim de evitar as manifestações agudas de descompensação metabólica, é difícil extrapolar nossos dados para pacientes visto que vários estudos clínicos que avaliaram os efeitos de antioxidantes em diferentes doenças neurodegenerativas não demonstraram, em sua maioria, os mesmos efeitos benéficos vistos em modelos animais ou células de pacientes (BARRECA et al., 2016; DEKOSKY et al., 2008; POHL; LIN, 2018; POSTUMA et al., 2017; RAFII et al., 2011). Contudo, visto que: **a)** vários estudos têm demonstrado que o aparecimento e progressão dos sintomas na deficiência da SO tem o envolvimento do acúmulo de sulfito, **b)** que o dano mitocondrial causando o aumento dos níveis de espécies reativas via sulfito é uma característica importante da doença, e **c)** que o JP4-039 é um antioxidante direcionado para a mitocôndria, nossos achados sugerem que essa molécula possa ser um promissor adjuvante terapêutico no tratamento de patologias com a deficiência da SO.

III.2. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho indicam que o acúmulo dos metabólitos sulfito e tiosulfato são tóxicos para os pacientes tanto com a ISOD como com MoCD. Verificamos que ambos os metabólitos causam alterações nas defesas antioxidantes no cérebro de ratos jovens e neonatos, conforme analisados a partir da

administração de sulfito e tiosulfato, respectivamente. Verificamos que o sulfito, além de causar danos às atividades de enzimas antioxidantes, também altera seu conteúdo proteico. Já o tiosulfato, além de causar alteração nas atividades destas enzimas, também levou a um aumento no conteúdo de espécies reativas.

Também verificamos que ambos os metabólitos causam prejuízos na homeostase energética do cérebro. Tanto o sulfito como o tiosulfato causaram diminuição da atividade da enzima CK, envolvida no transporte energético. Já o tiosulfato alterou também a atividade do complexo II da cadeia transportadora de elétrons, envolvido na produção de energia. Contudo, é importante considerar que o sulfito e o tiosulfato causam mais efeitos tóxicos sobre a homeostase redox do que sobre a bioenergética.

O sulfito, por sua vez, levou a alterações na ativação de proteínas envolvidas na via de sinalização das MAPKs. Além disso, também causou alteração tanto na ativação como no conteúdo de proteínas envolvidas na via de sinalização de apoptose. Esse efeito ocorre provavelmente devido ao fato de que o sulfito leva à abertura poro de transição da permeabilidade mitocondrial, causando a liberação do citocromo c e morte celular.

Por fim, verificamos que o JP4-039, um sequestrador de elétrons e espécies reativas direcionado à mitocôndria, foi capaz de prevenir a maioria das alterações causadas pelo sulfito. Estes efeitos protetores do JP4-039, além de sugerir que possa ser um promissor adjuvante terapêutico, nos forneceram indicações de possíveis formas pelo qual o sulfito exerce seus efeitos tóxicos sobre a atividade e conteúdo de enzimas, defesas antioxidantes, produção de ERO, produção e transporte de energia e, inclusive, sinalização de morte celular.

III.3. PERSPECTIVAS

- Avaliar os efeitos da injeção intraestriatal de sulfito e do pré-tratamento com o antioxidante JP4-039, via administração intraperitoneal, sobre a fosforilação da GSK-3 β e produção de espécies reativas (oxidação de DCFH, marcação com MitoSOXTM e conteúdo de nitratos e nitritos) em estriado de ratos jovens;
- Avaliar os efeitos da injeção intraestriatal de sulfito e do pré-tratamento com o antioxidante JP4-039, via administração intraperitoneal, sobre a reatividade glial (imunomarcação com GFAP e S100B) e o dano neuronal (imunomarcação com NeuN) em estriado de ratos jovens;
- Avaliar os efeitos do pós-tratamento com o antioxidante JP4-039, via administração intraperitoneal, sobre os efeitos tóxicos da injeção intraestriatal de sulfito em estriado de ratos jovens;
- Avaliar os efeitos do pré e pós-tratamento com o antioxidante JP4-039, via administração intraperitoneal, sobre os efeitos tóxicos causados pela injeção intracerebroventricular de tiosulfato em cérebro de ratos neonatos.

REFERÊNCIAS

- ABEDINZADEH, Z. Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 79, n. 2, p. 166–170, 2001.
- ABERLE, H. et al. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO journal*, v. 16, n. 13, p. 3797–804, 1997.
- ADAMS, B.; MAPANGA, R. F.; ESSOP, M. F. Partial inhibition of the ubiquitin-proteasome system ameliorates cardiac dysfunction following ischemia-reperfusion in the presence of high glucose. *Cardiovascular Diabetology*, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2015.
- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHMED, A. et al. Copper-Induced Inactivation of Camel Liver Glutathione S-Transferase. *Biological Trace Element Research*, v. 169, n. 1, p. 69–76, 2016.
- ALONZO MARTÍNEZ, M. et al. Molybdenum Cofactor Deficiency: Mega Cisterna Magna in Two Consecutive Pregnancies and Review of the Literature. *The Application of Clinical Genetics*, v. Volume 13, p. 49–55, 2020.
- ARSTALL, M. A. et al. Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 30, n. 5, p. 979–988, 1998.
- ATWAL, P. S.; SCAGLIA, F. Molybdenum cofactor deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 117, n. 1, p. 1–4, 2016.
- BAKER, M. T.; DEHRING, D. J.; GREGERSON, M. S. Sulfite supported lipid peroxidation in propofol emulsions. *Anesthesiology*, v. 97, n. 5, p. 1162–1167, 2002.
- BARRECA, D. et al. Neuroprotective effects of quercetin: from chemistry to medicine. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, v. 15, n. 8, p. 964–975, 2016.
- BASHEER, S. et al. Isolated Sulfite Oxidase Deficiency in the Newborn: Lactic Acidemia and Leukoencephalopathy. *Neuropediatrics*, v. 38, n. 1, p. 38–41, 2007.
- BERHANE, H. et al. Amelioration of Radiation-Induced Oral Cavity Mucositis and Distant Bone Marrow Suppression in Fanconi Anemia *Fancd2*^{-/-} (FVB/N) Mice by Intraoral GS-Nitroxide JP4-039. *Radiation Research*, v. 182, n. 1, p. 35, 2014a.
- BERHANE, H. et al. Radiologic Differences between Bone Marrow Stromal and Hematopoietic Progenitor Cell Lines from Fanconi Anemia (*Fancd2*^{-/-}) Mice. *Radiation Research*, v. 181, n. 1, p. 76, 2014b.
- BHAT, M.; ISMAIL, A. Vitamin D treatment protects against and reverses oxidative stress induced muscle proteolysis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 152, p. 171–179, 2015.
- BINDU, P. S. et al. Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. *Gene Reviews*, p. 1-14, 1993.
- BINDU, P. S. et al. Clinical and imaging observations in isolated sulfite oxidase deficiency. *Journal of Child Neurology*, v. 26, n. 8, p. 1036–1040, 2011.
- BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 2, p. 85–100, 2020.
- BOSLEY, T. M. et al. Neurologic injury in isolated sulfite oxidase deficiency. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, v. 41, n. 1, p. 42–48, 2014.
- BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced Glutathione and Glutathione Disulfide. *Free Radical and Antioxidant Protocols*, v. 108, p. 347-352, 1998.

- BRYK, D.; OLEJARZ, W.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D. Mitogen-activated protein kinases in atherosclerosis. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, v. 68, p. 10–22, 2014.
- CERVELLATI, C. et al. Impaired enzymatic defensive activity, mitochondrial dysfunction and proteasome activation are involved in RTT cell oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1852, n. 10, p. 2066–2074, 2015.
- CHAN, K. Y. et al. Infantile isolated sulphite oxidase deficiency in a Chinese family: a rare neurodegenerative disorder. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi / Hong Kong Academy of Medicine*, v. 8, n. 4, p. 279–282, 2002.
- CHEN, L.-W.; TSAI, Y.-S.; HUANG, C.-C. Prenatal Multicystic Encephalopathy in Isolated Sulfite Oxidase Deficiency With a Novel Mutation. *Pediatric Neurology*, v. 51, n. 1, p. 181–182, 2014.
- CHRISTNER, S. et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the quantitation of the novel radiation protective agent and radiation mitigator JP4-039 in murine plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 150, p. 169–175, 2018.
- COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, v. 326, n. 1, p. 1–16, 1997.
- CROSS, D. A. E. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, v. 378, n. 6559, p. 785–789, 1995.
- DA SILVA, C. G. et al. Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by d-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1586, n. 1, p. 81–91, 2002.
- DE MOURA ALVORCEM, L. et al. Disruption of Energy Transfer and Redox Status by Sulfite in Hippocampus, Striatum, and Cerebellum of Developing Rats. *Neurotoxicity Research*, v. 32, n. 2, p. 264–275, 2017.
- DEKOSKY, S. T. et al. Ginkgo biloba for prevention of dementia: a randomized controlled trial. *JAMA*, v. 300, n. 19, p. 2253–62, 2008.
- DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1830, n. 5, p. 3217–3266, 2013.
- DERIN, N. et al. Effect of alpha-lipoic acid on visual evoked potentials in rats exposed to sulfite. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 31, n. 1, p. 34–39, 2009.
- DI MEO, I.; LAMPERTI, C.; TIRANTI, V. Mitochondrial diseases caused by toxic compound accumulation: from etiopathology to therapeutic approaches. *EMBO Molecular Medicine*, v. 7, n. 10, p. 1257–1266, 2015.
- DOORN, J. A.; PETERSEN, D. R. Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chemico-Biological Interactions*, v. 143–144, p. 93–100, 2003.
- DORSTYN, L.; AKEY, C. W.; KUMAR, S. New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death & Differentiation*, v. 25, n. 7, p. 1194–1208, 2018.
- DU, F. et al. Creatine kinase and ATP synthase reaction rates in human frontal lobe measured by ³¹P magnetization transfer spectroscopy at 4T. *Magnetic Resonance Imaging*, v. 31, n. 1, p. 102–108, 2013.
- EDWARDS, M. C. et al. Isolated sulfite oxidase deficiency: Review of two cases in one family. *Ophthalmology*, v. 106, n. 10, p. 1957–1961, 1999.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic*

- Pathology, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
- EMBI, N.; RYLATT, D. B.; COHEN, P. Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle. *European Journal of Biochemistry*, v. 107, n. 2, p. 519–527, 2005.
- ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. *Methods in Molecular Biology*, v. 594, p. 57-72, 2010.
- ESPINOSA-DIEZ, C. et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, v. 6, p. 183–197, 2015.
- EVELSON, P. et al. Evaluation of Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) of Tissue Homogenates and Their Cytosols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 388, n. 2, p. 261–266, 2001.
- FADEEL, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*, v. 258, n. 6, p. 479–517, 2005.
- FISCHER, J. C. et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica Chimica Acta*, v. 153, n. 1, p. 23–36, 1985.
- FRANTZ, M.-C. et al. Large-Scale Asymmetric Synthesis of the Bioprotective Agent JP4-039 and Analogs. *Organic Letters*, v. 13, n. 9, p. 2318–2321, 2011.
- FRANTZ, M.-C. et al. Synthesis of analogs of the radiation mitigator JP4-039 and visualization of BODIPY derivatives in mitochondria. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 11, n. 25, p. 4147, 2013.
- GARRETT, R. M.; RAJAGOPALAN, K. V. Site-directed mutagenesis of recombinant sulfite oxidase: Identification of cysteine 207 as a ligand of molybdenum. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 13, p. 7387–7391, 1996.
- GILBERT, D. L. *Oxygen and living processes: an interdisciplinary approach*. Springer Science & Business Media, 2012.
- GRINGS, M. et al. Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: Potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency. *Gene*, v. 531, n. 2, p. 191–198, 2013.
- GRINGS, M. et al. Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1842, n. 9, p. 1413–1422, 2014.
- GRINGS, M. et al. Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, antioxidant system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: Implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1863, n. 9, p. 2135–2148, 2017.
- GRINGS, M. et al. Evidence that Thiosulfate Inhibits Creatine Kinase Activity in Rat Striatum via Thiol Group Oxidation. *Neurotoxicity Research*, v. 34, n. 3, p. 693–705, 2018.
- GRINGS, M. et al. ETHE1 and MOCS1 deficiencies: Disruption of mitochondrial bioenergetics, dynamics, redox homeostasis and endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in patient fibroblasts. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.
- HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life*. *Plant Physiology*, v. 141, n. 2, p. 312–322, 1 jun. 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA, 2015a.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, 2015b. v. 3
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.
- HAYON, E.; TREININ, A.; WILF, J. Electronic Spectra, Photochemistry, and Autoxidation Mechanism of the Sulfite-Bisulfite-Pyrosulfite Systems. the SO₂-, SO₃-, SO₄-, and SO₅- Radicals. *Journal of the American Chemical Society*, v. 94, n. 1, p. 47–57, 1972.
- HERKEN, E. N. et al. Effect of sulfite treatment on total antioxidant capacity, total oxidant status, lipid hydroperoxide, and total free sulfhydryl groups contents in normal and sulfite oxidase-deficient rat plasma. *Cell Biology and Toxicology*, v. 25, n. 4, p. 355–362, 2009.
- HIGUCHI, R. et al. Early features in neuroimaging of two siblings with molybdenum cofactor deficiency. *Pediatrics*, v. 133, n. 1, 2014.
- HOBSON, E. E. et al. Isolated sulphite oxidase deficiency mimics the features of hypoxic ischaemic encephalopathy. *European Journal of Pediatrics*, v. 164, n. 11, p. 655–659, 2005.
- HOLDER, J. L. et al. Infantile spasms and hyperekplexia associated with isolated sulfite oxidase deficiency. *JAMA Neurology*, v. 71, n. 6, p. 782–784, 2014.
- HUGHES, B. P. A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clinica Chimica Acta*, v. 7, n. 5, p. 597–603, 1962.
- HURST, S.; HOEK, J.; SHEU, S.-S. Mitochondrial Ca²⁺ and regulation of the permeability transition pore. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 49, n. 1, p. 27–47, 2017.
- HUXTABLE, R. J. Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews*, v. 72, n. 1, p. 101–163, 1992.
- INGLÉS, M. et al. Active paraplegics are protected against exercise-induced oxidative damage through the induction of antioxidant enzymes. *Spinal Cord*, v. 54, n. 10, p. 830–837, 2016.
- JACKSON, M. R.; MELIDEO, S. L.; JORNS, M. S. Human Sulfide:Quinone Oxidoreductase Catalyzes the First Step in Hydrogen Sulfide Metabolism and Produces a Sulfane Sulfur Metabolite. *Biochemistry*, v. 51, n. 34, p. 6804–6815, 2012.
- JALMI, S. K.; SINHA, A. K. ROS mediated MAPK signaling in abiotic and biotic stress- striking similarities and differences. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, n. September, p. 1–9, 2015.
- JI, A. J.; SAVON, S. R.; JACOBSEN, D. W. Determination of total serum sulfite by HPLC with fluorescence detection. *Clinical chemistry*, v. 41, n. 6, p. 897–903, 1995.
- JOHNSON, J. L. Prenatal diagnosis of molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. *Prenatal Diagnosis*, v. 23, n. 1, p. 6–8, 2003.
- JOHNSON, J. L.; DURAN, M. Molybdenum Cofactor Deficiency and Isolated Sulfite Oxidase Deficiency. In: VALLE, D. et al. (Eds.). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, p. 3181–3217, 2001.
- JULIEN, O.; WELLS, J. A. Caspases and their substrates. *Cell Death and Differentiation*, v. 24, n. 8, p. 1380–1389, 2017.
- KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, v. 7, n. 3, p. 153–163, 2000.

- KAPLAN, P. et al. Homocysteine and Mitochondria in Cardiovascular and Cerebrovascular Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 20, p. 7698, 2020.
- KELSO, G. F. et al. Selective Targeting of a Redox-active Ubiquinone to Mitochondria within Cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 7, p. 4588–4596, 2001.
- KISKER, C. et al. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell*, v. 91, n. 7, p. 973–983, 1997.
- KONOREV, E. A.; HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxyntirite. *FEBS Letters*, v. 427, n. 2, p. 171–174, 1998.
- KRISHNA RAO, K. M. et al. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 51, n. 5, p. 496–500, 1992.
- KÜÇÜKATAY, V. et al. Visual evoked potentials in normal and sulfite oxidase deficient rats exposed to ingested sulfite. *NeuroToxicology*, v. 27, n. 1, p. 93–100, 2006.
- KUMAR, A. et al. S-sulfocysteine/NMDA receptor-dependent signaling underlies neurodegeneration in molybdenum cofactor deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 12, p. 4365–4378, 2017.
- LAUBER, K. et al. Clearance of Apoptotic Cells. *Molecular Cell*, v. 14, n. 3, p. 277–287, 2004.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, v. 5, n. 2, p. 227–231, 1992.
- LEIPNITZ, G. et al. Evaluation of mitochondrial bioenergetics, dynamics, endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk, and reactive oxygen species in fibroblasts from patients with complex I deficiency. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1165, 18 dez. 2018.
- LEUNG, K. H.; POST, G. B.; MENZEL, D. B. Glutathione S-sulfonate, a sulfur dioxide metabolite, as a competitive inhibitor of glutathione S-transferase, and its reduction by glutathione reductase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 77, n. 3, p. 388–394, 1985.
- LEVINE, R. L. et al. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 26, p. 15036–15040, 1996.
- LI, J.-T. et al. Mutation analysis of SUOX in isolated sulfite oxidase deficiency with ectopia lentis as the presenting feature: insights into genotype–phenotype correlation. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, v. 17, n. 1, p. 392, 2022.
- LINDBLOM, R. et al. Targeting mitochondria and reactive oxygen species-driven pathogenesis in diabetic nephropathy. *Review of Diabetic Studies*, v. 12, n. 1, p. 134–156, 2015.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 51, p. 265–275, 1951.
- LU, S. C. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1830, n. 5, p. 3143–3153, 2013.
- MANNERVIK, B.; GUTHENBERG, C. [28] Glutathione transferase (human placenta). *Journal of Chemical Information and Modeling*, p. 231–235, 1981.

- MAPANGA, R. F. et al. Oleonic Acid: A Novel Cardioprotective Agent That Blunts Hyperglycemia-Induced Contractile Dysfunction. *PLoS ONE*, v. 7, n. 10, p. e47322, 2012.
- MARKLUND, S. L. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Letters*, v. 184, n. 2, p. 237–239, 1985.
- MAURER, U. et al. GSK-3 -at the crossroads of cell death and survival. *Journal of Cell Science*, v. 127, n. 7, p. 1369–1378, 2014.
- MELLIS, A.-T. et al. Sulfite Alters the Mitochondrial Network in Molybdenum Cofactor Deficiency. *Frontiers in Genetics*, v. 11, n. January, p. 1–10, 2021.
- MENDEL, R. R.; LEIMKÜHLER, S. The biosynthesis of the molybdenum cofactors. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 20, n. 2, p. 337–347, 2015.
- MOTTLEY, C.; MASON, R. P. Sulfate anion free radical formation by the peroxidation of (Bi) sulfite and its reaction with hydroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 267, n. 2, p. 681–689, 1988.
- MURAKAMI, K. et al. Copper-dependent inhibition and oxidative inactivation with affinity cleavage of yeast glutathione reductase. *BioMetals*, v. 27, n. 3, p. 551–558, 2014.
- MURPHY, M. P. et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, v. 4, n. 6, p. 651–662, 2022.
- NETA, P.; HUIE, R. E. Free-radical chemistry of sulfite. *Environmental Health Perspectives*, v. VOL. 64, p. 209–217, 1985.
- NINFALI, P. et al. Rabbit brain glucose-6-phosphate dehydrogenase: Biochemical properties and inactivation by free radicals and 4-hydroxy-2-nonenal. *NeuroReport*, v. 12, n. 18, p. 4149–4153, 2001.
- OLIVERA-BRAVO, S. et al. Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric Acidemia-I. *PLoS ONE*, v. 6, n. 6, p. 1–10, 2011.
- OLIVERA-BRAVO, S. et al. White Matter Injury Induced by Perinatal Exposure to Glutaric Acid. *Neurotoxicity Research*, v. 25, n. 4, p. 381–391, 2014.
- ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 460, n. 1, p. 72–81, 2015.
- OZTURK, O. H. et al. Effect of sulfite on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in normal and sulfite oxidase-deficient rat erythrocytes. *Journal of Physiology and Biochemistry*, v. 66, n. 3, p. 205–212, 2010.
- PARMEGGIANI, B. et al. In vitro evidence that sulfite impairs glutamatergic neurotransmission and inhibits glutathione metabolism-related enzymes in rat cerebral cortex. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 42, p. 68–75, 2015.
- PIGEOLET, E. et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 51, n. 3, p. 283–297, 1990.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 97, p. 55–74, 2015.
- POHL, F.; LIN, P. K. T. The potential use of plant natural products and plant extracts with antioxidant properties for the prevention/treatment of neurodegenerative diseases: In vitro, in vivo and clinical trials. *Molecules*, v. 23, n. 12, 2018.
- POSTUMA, R. B. et al. Caffeine as symptomatic treatment for Parkinson disease

- (Café-PD). *Neurology*, v. 89, n. 17, p. 1795–1803, 2017.
- RADI, E. et al. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 42, p. S125–S152, 2014.
- RAFII, M. S. et al. A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, v. 76, n. 16, p. 1389–1394, 2011.
- RAVICHANDRAN, K. S. Beginnings of a Good Apoptotic Meal: The Find-Me and Eat-Me Signaling Pathways. *Immunity*, v. 35, n. 4, p. 445–455, 2011.
- RHYU, D. Y. et al. Role of reactive oxygen species in TGF- β 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 16, n. 3, p. 667–675, 2005.
- ROBINSON, H.; PASTERNAK, C. The isolation of S -sulphogluthione from the small intestine of the rat. *Biochemical Journal*, v. 93, n. 3, p. 487–492, 1964.
- ROCHA, S. et al. Sulfite oxidase deficiency – An unusual late and mild presentation. *Brain and Development*, v. 36, n. 2, p. 176–179, 2014.
- ROSCA, M. G.; HOPPEL, C. L. Mitochondrial dysfunction in heart failure. *Heart Failure Reviews*, v. 18, n. 5, p. 607–622, 2013.
- ROSSIGNOL, D. A.; FRYE, R. E. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, v. 17, n. 3, p. 290–314, 2012.
- RWIGEMA, J.-C. M. et al. Two Strategies for the Development of Mitochondrion-Targeted Small Molecule Radiation Damage Mitigators. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*, v. 80, n. 3, p. 860–868, 2011.
- SANTABÁRBARA-RUIZ, P. et al. ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during *Drosophila* Regeneration. *PLoS Genetics*, v. 11, n. 10, p. 1–26, 2015.
- SASS, J. O. et al. Functional deficiencies of sulfite oxidase: Differential diagnoses in neonates presenting with intractable seizures and cystic encephalomalacia. *Brain and Development*, v. 32, n. 7, p. 544–549, 2010.
- SCHWAHN, B. C. et al. Efficacy and safety of cyclic pyranopterin monophosphate substitution in severe molybdenum cofactor deficiency type A: a prospective cohort study. *The Lancet*, v. 386, n. 10007, p. 1955–1963, 2015.
- SCHWARZ, G. Molybdenum cofactor and human disease. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 31, p. 179–187, abr. 2016.
- SCHWARZ, G.; BELAIDI, A. A. Molybdenum in Human Health and Disease. *Metal Ions in Life Sciences*, v. 13, p. 415–450, 2013.
- SCHWARZ, G.; MENDEL, R. R.; RIBBE, M. W. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *Nature*, v. 460, n. 7257, p. 839–847, 2009.
- SEMINOTTI, B. et al. Mitochondrial energetics is impaired in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and can be rescued by treatment with mitochondria-targeted electron scavengers. *Human Molecular Genetics*, v. 28, n. 6, p. 928–941, 2019.
- SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, v. 106–107, p. 1–16, 2013.
- SHEN, H. et al. Identification of Cysteine Residues Involved in Disulfide Formation in the Inactivation of Glutathione Transferase P-Form by Hydrogen Peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 300, n. 1, p. 137–141, 1993.
- SHINDE, A. et al. Intraoral Mitochondrial-Targeted GS-Nitroxide, JP4-039, Radioprotects Normal Tissue in Tumor-Bearing Radiosensitive *Fancd2*^{-/-}

- (C57BL/6) Mice. *Radiation Research*, v. 185, n. 2, p. 134, 2016.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, v. 82, n. 2, p. 291–295, 1997.
- SMITH, R. A. . et al. Targeting Coenzyme Q Derivatives to Mitochondria. *Methods in Enzymology*, v. 382, p. 45-67.
- SPIEGEL, R. et al. Molybdenum cofactor deficiency: A natural history. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 45, n. 3, p. 456–469, 2022.
- STACHOWIAK, O. et al. Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite- induced modification and inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 27, p. 16694–16699, 1998.
- TAN, W. H. et al. Isolated sulfite oxidase deficiency: A case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics*, v. 116, n. 3, p. 757–766, 2005.
- TOUATI, G. et al. Dietary therapy in two patients with a mild form of sulphite oxidase deficiency. Evidence for clinical and biological improvement. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 23, n. 1, p. 45–53, 2000.
- VELDMAN, A. et al. Successful Treatment of Molybdenum Cofactor Deficiency Type A With cPMP. *PEDIATRICS*, v. 125, n. 5, p. e1249–e1254, 2010.
- VIJAYAKUMAR, K. et al. Clinical neuroimaging features and outcome in molybdenum cofactor deficiency. *Pediatric Neurology*, v. 45, n. 4, p. 246–252, 2011.
- VISCOMI, C. et al. Combined treatment with oral metronidazole and N-acetylcysteine is effective in ethylmalonic encephalopathy. *Nature Medicine*, v. 16, n. 8, p. 869–871, 2010.
- WADA, T.; PENNINGER, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, v. 23, n. 16, p. 2838–2849, 2004.
- WALLIMANN, T. et al. Creatine kinase: An enzyme with a central role in cellular energy metabolism. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology, and Medicine*, v. 6, n. 2–3, p. 116–119, 1998.
- WANG, C. et al. Cholesterol Enhances Colorectal Cancer Progression *via* ROS Elevation and MAPK Signaling Pathway Activation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 42, n. 2, p. 729–742, 2017.
- WENDT, S.; SCHLATTNER, U.; WALLIMANN, T. Differential effects of peroxynitrite on human mitochondrial creatine kinase isoenzymes: Inactivation, octamer destabilization, and identification of involved residues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 2, p. 1125–1130, 2003.
- WESTERLINCK, H. et al. Sulfite oxidase deficiency in a newborn. *Jbr-Btr*, v. 97, n. 2, p. 113–114, 2014.
- WIPF, P. et al. Mitochondrial targeting of selective electron scavengers: Synthesis and biological analysis of hemigrammidin-TEMPO conjugates. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 36, p. 12460–12461, 2005.
- WOLOSKER, H.; PANIZZUTTI, R.; ENGELENDER, S. Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Letters*, v. 392, n. 3, p. 274–276, 1996.
- WYSE, A. T. S. et al. The Role of Oxidative Stress and Bioenergetic Dysfunction in Sulfite Oxidase Deficiency: Insights from Animal Models. *Neurotoxicity Research*, v. 35, n. 2, p. 484–494, 2019.
- YANG, G. et al. Resveratrol Alleviates Rheumatoid Arthritis *via* Reducing ROS and Inflammation, Inhibiting MAPK Signaling Pathways, and Suppressing Angiogenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 49, p. 12953–12960, 2018.

- ZHANG, J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, n. Figure 1, p. 1–18, 2016.
- ZHANG, X. et al. A Mechanism of Sulfite Neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 41, p. 43035–43045, 2004.