



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LUIZA CRUZ SILVEIRA

**O METABOLISMO DA TETRAIDROBIOPTERINA SE ENCONTRA PREJUDICADO
EM DEFICIÊNCIAS MITOCONDRIAIS GENÉTICAS E INDUZIDAS
QUIMICAMENTE**

Florianópolis

2023

LUISA CRUZ SILVEIRA

**O METABOLISMO DA TETRAHIDROBIOPTERINA É PREJUDICADO POR
DEFICIÊNCIAS MITOCONDRIAS GENÉTICAS E INDUZIDAS QUIMICAMENTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Alexandra Latini
Coorientador: Jose Abdenur

Florianópolis

2023

Silveira, Luisa Cruz

O METABOLISMO DA TETRAIDROBIOPTERINA SE ENCONTRA PREJUDICADO EM DEFICIÊNCIAS MITOCONDRIAIS GENÉTICAS E INDUZIDAS QUIMICAMENTE / Luisa Cruz Silveira ; orientadora, Alexandra Latini, coorientador, Jose Abdenur, 2024.

89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Disfunção mitocondrial . 3. Metabolismo energético. 4. Metabolismo da BH4. I. Latini, Alexandra . II. Abdenur, Jose . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

LUISA CRUZ SILVEIRA

O METABOLISMO DA TETRAHIDROBIOPTERINA É PREJUDICADO POR DEFICIÊNCIAS MITOCONDRIAS GENÉTICAS E INDUZIDAS QUIMICAMENTE

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 16 de fevereiro de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Gustavo Ferreira, Dr.

Instituição Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.(a) Rozangela Curi Pedrosa, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Patricia Schuck, Dr.(a)

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.(a) Ariane Zamoner, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Alexandra Latini, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2024

Dedico este trabalho ao meu filho, Adonis, minha inabalável fonte de inspiração e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Expresso minha profunda gratidão à minha orientadora, Alexandra Latini, por conceder-me inúmeras oportunidades, depositar confiança em meu trabalho e fornecer encorajamento ao longo desta jornada acadêmica.

Ao meu coorientador, José Abdenur, e ao E-lab, expresso minha sincera gratidão pela valiosa oportunidade de participar no projeto e pela rica experiência adquirida no estudo das mitocondriopatias.

À Professora Juliana Lindenau e ao Laboratório de Polimorfismos Genéticos, manifesto meu agradecimento pela colaboração e por compartilhar ensinamentos preciosos ao longo desse percurso acadêmico.

À Professora Ana Lucia De Paul e ao Departamento de Microscopia Eletrônica da Universidad Nacional de Córdoba, agradeço pela colaboração significativa e pelo apoio fundamental.

Ao núcleo de bioinformática da UFSC e à Superintendência de Governança Eletrônica e Tecnologia da Informação e Comunicação (SeTIC), expresso meu reconhecimento pela imprescindível assistência e pela disponibilização do servidor que viabilizou a execução deste trabalho.

À Professora Joana Gaspar e ao laboratório de Neuro-Imuno Metabolismo, minha gratidão pela convivência enriquecedora e apoio constante.

Dirijo meu agradecimento a todos os colegas do LABOX, tanto os atuais quanto os que já fizeram parte, por suas contribuições significativas para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e a todos os professores que integraram minha trajetória acadêmica, expresso minha sincera gratidão.

Agradeço, de coração, a todos os amigos e colegas que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho e para minha formação ao longo do tempo.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), expresso minha gratidão pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

Por fim, dedico um especial agradecimento à minha família, meu bem mais precioso, pelo apoio incondicional ao longo de toda esta jornada.

“Compartilhe o seu conhecimento. É uma forma de alcançar a imortalidade.” Dalai Lama

RESUMO

O metabolismo da tetraidrobiopterina (BH4) emergiu recentemente como um novo alvo metabólico que pode ser modulado positivamente para compensar processos tóxicos que podem resultar em morte celular. Nosso grupo demonstrou recentemente que a BH4 em concentrações fisiológicas é essencial para um apropriado metabolismo e dinâmica mitocondrial, para a regulação da resposta inflamatória, e para a ativação das defesas antioxidantes. Considerando que as doenças mitocondriais são caracterizadas por déficits energéticos, estresse oxidativo e inflamação, o objetivo deste trabalho foi investigar se o metabolismo da BH4 se encontra comprometido em duas deficiências mitocondriais. O metabolismo da BH4 e a fisiologia e dinâmica mitocondrial foram investigados nos tecidos e fluídos de uma deficiência energética induzida quimicamente pela administração de reserpina em roedores e em fibroblastos obtidos de indivíduos acometidos por distúrbio mitocondrial primário genético, a deficiência em DARS2. A deficiência de DARS2 é caracterizada por leucoencefalopatia com envolvimento do tronco encefálico e da medula espinhal, bem como elevação de ácido láctico central e periférico. A reserpina é empregada para indução experimental da doença de Parkinson, atuando como um inibidor do transportador vesicular da dopamina e comprometendo a sinalização dopaminérgica. O metabolismo da BH4 foi caracterizado pela mensuração da expressão gênica e atividade das principais enzimas biossintéticas da BH4. A expressão gênica diferencial foi avaliada pela análise do transcriptoma. A fisiologia mitocondrial foi investigada pela avaliação das atividades dos complexos na cadeia respiratória, e a dinâmica mitocondrial por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os fibroblastos de indivíduos afetados pela deficiência em DARS2 foram estabelecidos a partir de biópsias de pele de dois irmãos afetados (Paciente 1: 8 anos e Paciente 2: 4 anos) e de um irmão assintomático, que não é portador (Controle). Os camundongos que receberam reserpina mostraram inibição do complexo I da cadeia respiratória no estriado e alterações na dinâmica mitocondrial caracterizadas por aumento no tamanho e ramificação da mitocôndria no músculo esquelético. Essas alterações estiveram associadas a níveis reduzidos de BH4 no cérebro, no soro e na urina. Os fibroblastos deficientes em DARS2 exibiram atividades reduzidas dos complexos I e IV da cadeia respiratória. A análise do transcriptoma revelou a regulação negativa de genes envolvidos na produção de BH4 e de várias proteínas mitocondriais relacionadas à produção de energia, incluindo as subunidades dos complexos I, III, IV e V, bem como a regulação positiva de genes ligados à ativação da resposta à hipóxia. Esse comprometimento no metabolismo da BH4 foi confirmado pela avaliação da expressão de *GCH1*, gene chave envolvido na produção de BH4. Além disso, a atividade de GTPCH (codificada por *GCH1*) não foi modificada quando estimulada com o ativador canônico, lipopolissacarídeo (LPS; 24 h; 2 mg/mL). A redução na capacidade de síntese de BH4 não foi justificada pela presença de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *GCH1*, os que previamente tinham sido reportados por estarem associados a uma síntese reduzida de BH4. A informação apresentada neste trabalho mostra uma nova e íntima associação entre a fisiologia e dinâmica mitocondrial comprometidas com a deficiência de BH4 em tecidos com alta demanda energética. Assim, pode ser postulado que a administração de BH4 pode resultar em uma nova abordagem para o tratamento de distúrbios mitocondriais, principalmente os de origem genética, para os quais não existe terapia eficaz.

Palavras-chave: antioxidante; metabolismo da BH4; disfunção mitocondrial.

ABSTRACT

The metabolism of tetrahydrobiopterin (BH4) has recently emerged as a new metabolic target that can be positively modulated to counterbalance toxic processes that can result in cell death. Our group recently demonstrated that BH4 in physiological concentrations is essential for proper mitochondrial metabolism and dynamics, for the regulation of the inflammatory response, and for the activation of the antioxidant defenses. Considering that mitochondrial diseases are characterized by energy deficits, oxidative stress and inflammation, the objective of this work was to investigate whether BH4 metabolism is compromised in two mitochondrial deficiencies. BH4 metabolism and mitochondrial physiology and dynamics were investigated in tissues and fluids from two systems with energy deficiency. One of them was chemically induced by the administration of reserpine in rodents. The second one was represented by fibroblasts obtained from individuals affected by the genetic mitochondrial disorder, DARS2 deficiency. DARS2 deficiency is characterized by leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement, as well as elevated central and peripheral lactic acid. Reserpine is used by the scientific community for the experimental induction of Parkinson's disease. Reserpine inhibits the vesicular dopamine transporter, compromising dopaminergic signaling. BH4 metabolism was characterized by measuring gene expression and activity of the main BH4 biosynthetic enzymes. Differential gene expression was assessed by the analysis of the transcriptome. Mitochondrial physiology was investigated by evaluating the activities of the enzymatic complexes present in the respiratory chain. Mitochondrial dynamics was studied by transmission electron microscopy (TEM). Fibroblasts from individuals affected by DARS2 deficiency were established from skin biopsies of two affected siblings (Patient 1: 8 years and Patient 2: 4 years) and an asymptomatic sibling, who is not a carrier (Control). Mice receiving reserpine showed inhibition of complex I activity in the striatum, as well as changes in mitochondrial dynamics characterized by an increase in the size and branching of mitochondria in skeletal muscle. These changes were associated with reduced levels of BH4 in the brain, serum, and urine. DARS2-deficient fibroblasts exhibited reduced activities of complexes I and IV of the respiratory chain. Transcriptome analysis revealed the negative regulation of genes involved in the production of BH4 and several mitochondrial proteins related to energy production, including the subunits of complexes I, III, IV and V. Additionally, the positive regulation of genes linked to the activation of response to hypoxia was also identified. This impairment in BH4 metabolism was confirmed by evaluating the expression of *GCH1*, a key gene involved in the production of BH4. Furthermore, GTPCH activity (encoded by *GCH1*) was not modified when stimulated with the canonical activator, lipopolysaccharide (LPS; 24 h; 2 mg/mL). The reduction in the capacity to synthesize BH4 was not justified by the presence of single nucleotide polymorphisms in the *GCH1* gene, which had previously been reported to be associated with reduced BH4 synthesis. The information presented in this work shows a new and intimate association between mitochondrial physiology and dynamics with the BH4 metabolism in tissues with high energy demand. Altogether, it can be postulated that the administration of BH4 could result in a new approach to the treatment of mitochondrial disorders, especially those of genetic origin for which there is no cure or effective treatment.

Keywords: antioxidant, BH4 metabolism, mitochondrial dysfunction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias metabólicas envolvidas na produção da tetraidrobiopterina (BH4) ...	30
Figura 2 - Comprometimento do metabolismo da BH4 na deficiência energética induzida pela reserpina em camundongos suíços.....	51
Figura 3 - Atividade das enzimas dos complexos I, II, e IV da cadeia respiratória em fibroblastos deficientes em DARS2	53
Figura 4 - Análise de expressão gênica diferencial em fibroblastos deficientes em DARS2	55
Figura 5 - Análise de enriquecimento dos genes diferencialmente expressos em fibroblastos deficientes em DARS2	58
Figura 6 - Associação de genes e processos biológicos enriquecidos em fibroblastos deficientes em DARS	60
Figura 7 - Expressão diferencial dos genes envolvidos nas vias de síntese de tetraidrobiopterina (BH4) em fibroblastos deficientes em DARS2	65
Figura 8 - A via de novo da tetraidrobiopterina (BH4) se encontra comprometida nos fibroblastos dos indivíduos afetados pela deficiência em DARS2	67
Figura 9 - Polimorfismos de nucleotídeo único (SNIP) do gene GCH1 identificados em fibroblastos deficientes em DARS2	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Quantidade de subunidades de cada complexo proteico da cadeia respiratória codificadas pelo DNA mitocondrial (mtDNA) e pelo DNA nuclear (nDNA)	24
Quadro 2 - Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene <i>GCH1</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mutações identificadas nos indivíduos afetados pela deficiência em DARS2	54
Tabela 2 - Principais genes diferencialmente expressos (DEGS) encontrados em fibroblastos deficientes em DARS2 ($P_{adj} \leq 0,05$; $\log_2\text{FoldChange} \leq -1$ ou ≥ 1) e as funções associadas aos genes	56
Tabela 3 - Principais genes envolvidos nos processos biológicos de resposta aos níveis de oxigênio encontrados enriquecidos em fibroblastos deficientes em DARS2	61
Tabela 4 - Expressão diferencial dos genes envolvidos nas vias de síntese da BH4 em fibroblastos deficientes em DARS2	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aaRSs	Aminoacil-tRNA sintetase
ADP	Adenosina difosfato
ASC	Proteína adaptadora apoptótica
ATP	Adenosina trifosfato
BH4	Tetraidrobiopterina
CHOC	<i>Children's Hospital of Orange County</i>
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CoQ	Coenzima Q
DARS2	aminoacil-tRNA sintetase classe II mitocondrial
DEGS	do inglês <i>Differentially expressed genes</i>
DHFR	Diidrofolato redutase
DMP	Doenças mitocondriais primárias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
DTE	Ditioeritritol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FADH2	Flavina adenina nucleotídeo
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FDR	do inglês <i>False Discovery Rate</i>
FMN	Flavina mononucleotídeo
GO	do inglês <i>Gene Ontology</i>
GTP	Guanosina trifosfato
GTPCH	Guanosina trifosfato ciclohidrolase
HPLC	Cromatografia líquida de alto rendimento
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL1- β	Interleucina 1 beta
IMF	Mitocôndrias Intermiofibrilares
iPSC	Células tronco pluripotentes induzida
IRB	Conselho de Revisão Institucional

KEGG	do inglês <i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LABOX	Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo
LBSL	Leucoencefalopatia com envolvimento do tronco encefálico e medula espinhal e elevação do lactato
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
MRI	Ressonância magnética
mt-AspRS	Aspartil-tRNA sintetase mitocondrial
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
nDNA	DNA nuclear
NGF	Fator de crescimento do nervo
Nrf-2	Fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2
ON	Óxido nítrico
PCA	do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PTPS	6-Piruvilil tetraidropterina sintase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
SPR	Sepiapterina redutase
SS	Mitocôndrias subsarcolemais
TCA	Acido tricloroacético
TIM	Translocase da membrana interna
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOM	Translocase da membrana externa mitocondrial
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VMAT2	Transportador vesicular de monoaminas tipo 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1	DOENÇAS MITOCONDRIAIS PRIMÁRIAS.....	23
2.2	A ATIVIDADE MITOCONDRIAL	24
2.3	A DOENÇA LBSL.....	26
2.4	INDUÇÃO QUÍMICA DE DEFICIÊNCIA MITOCONDRIAL DA RESPIRAÇÃO CELULAR; MODELO EXPERIMENTAL DE DP	28
2.5	O METABOLISMO DA BH4	29
3	HIPÓTESE	35
4	OBJETIVOS	35
4.1	OBJETIVO GERAL	35
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5	MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1	ANIMAIS	36
5.1.1	Experimentação animal com administração de reserpina	36
5.1.2	Coleta e processamento de amostras biológicas	37
5.1.2.1	<i>Plasma</i>	37
5.1.2.2	<i>Urina</i>	37
5.1.2.3	<i>Estriado</i>	37
5.1.2.4	<i>Músculo esquelético</i>	37
5.2	AMOSTRAS HUMANAS	38
5.2.1	Caracterização dos indivíduos afetados pela deficiência em DARS2 ..	38
5.2.2	Material biológico obtido dos indivíduos com deficiências em DARS2 e do controle	39
5.2.3	Fibroblastos	39
5.2.4	Processamento de amostras biológicas humanas	40
5.2.4.1	<i>Para quantificação da atividade dos complexos da cadeia respiratória</i>	40
5.2.4.2	<i>Para atividade enzimática</i>	40
5.2.4.3	<i>Extração do material genético</i>	40
5.3	MÉTODOS	41
5.3.1	MET	41
5.3.2	Quantificação da BH4	42

5.3.3	Atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória.....	42
5.3.4	Morfometria mitocondrial.....	42
5.3.5	Sequenciamento de RNA dos fibroblastos humanos.....	43
5.3.5.1	<i>Análise da qualidade e filtragem.....</i>	44
5.3.5.2	<i>Indexação do genoma de referência com anotação, alinhamento e mapeamento das leituras.....</i>	44
5.3.5.3	<i>Quantificação dos genes e geração da matriz de contagem.....</i>	44
5.3.6	Análise de expressão diferencial.....	45
5.3.7	Análise de enriquecimento.....	46
5.3.8	Expressão do gene <i>GCH1</i>.....	46
5.3.9	Atividade enzimática da GTPCH.....	46
5.3.10	Análise de polimorfismos do gene <i>GCH1</i>.....	46
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
6	RESULTADOS.....	49
6.1	O COMPROMETIMENTO DO METABOLISMO DA BH4 NA DEFICIÊNCIA ENERGÉTICA INDUZIDA PELA RESERPINA EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS.....	49
6.2	COMPROMETIMENTO DO METABOLISMO DA BH4 NO DÉFICIT ENERGÉTICO PROVOCADO PELA DEFICIÊNCIA GENÉTICA DE DARS2 EM FIBROBLASTOS HUMANOS.....	52
7	DISCUSSÃO.....	70
8	PERSPECTIVAS.....	80
9	CONCLUSÃO.....	80
10	REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

As doenças mitocondriais primárias (DMP) são um grupo heterogêneo de doenças genéticas hereditárias que ocorrem em aproximadamente 1 em 5.000 nascidos vivos (THORBURN, 2004). Essas doenças são caracterizadas por defeitos na estrutura e na função mitocondrial, resultantes de mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) ou no DNA nuclear (nDNA) (CHINNERY, 2001). As DMP podem afetar sistemas isolados ou ser multissistêmicas (GORMAN et al., 2016). As alterações na estrutura e na função mitocondrial podem comprometer o funcionamento da cadeia respiratória, desregular a homeostase do Ca^{2+} e induzir apoptose provocando desestabilizações no mtDNA. Com a diminuição da produção de energia os tecidos mais oxidativos são afetados, resultando no surgimento de doenças degenerativas (WALLACE, 2013). Até o momento existem apenas tratamentos paliativos e empíricos para as DMP (VU; HIRANO; DIMAURO, 2002). Sendo essas condições hereditárias altamente debilitantes com graves consequências para a saúde dos portadores, esse cenário representa um desafio para a medicina moderna, uma vez que novas opções de tratamento mais eficazes são necessárias.

A mitocôndria é uma organela celular responsável pela produção de energia, a qual contém proteínas envolvidas com a oxidação de nutrientes bem como com a respiração celular (NELSON; COX, 2014). A maquinaria molecular desta organela compreende enzimas presentes no ciclo do ácido cítrico e proteínas organizadas na membrana mitocondrial interna que fazem parte da cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória. Os complexos proteicos da cadeia transportadora de elétrons envolvidos na formação de energia e respiração celular são codificados pelo mtDNA e nDNA (DI DONATO, 2000). O complexo I é o maior componente proteico presente na membrana mitocondrial interna e é formado por sete unidades codificadas pelo mtDNA e por ao menos 34 subunidades codificadas pelo nDNA (VOET; VOET, 1995; DI DONATO, 2000).

A mitocôndria é o principal local de produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em condições fisiológicas, sendo os complexos I e III da cadeia respiratória os principais geradores de EROS nestas condições (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979). A produção de EROS é um mecanismo necessário em vários processos biológicos, entretanto, quando os níveis totais são maiores que a capacidade de defesa antioxidante, a geração de EROS se torna prejudicial ao organismo, podendo

comprometer a saúde celular (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001; DRÖGE, 2002).

Mutações no gene que codifica a aminoacil-tRNA sintetase classe II mitocondrial (DARS2) está associada ao distúrbio de leucoencefalopatia com envolvimento do tronco encefálico e medula espinhal e elevação do lactato (LBSL) (SCHEPER et al., 2007). A deficiência em DARS2 resulta em prejuízos na síntese de proteínas mitocondriais, devido à participação dessa enzima na tradução proteica mitocondrial. Assim, mutações em DARS2 resultam em redução dos níveis das subunidades dos complexos I, III e IV, por exemplo, provocando deficiências energéticas (DOGAN et al., 2014).

A LBSL é uma doença denominada rara, caracterizada por uma série de distúrbios neurológicos que normalmente iniciam na infância. Uma das características deste distúrbio é a degeneração da bainha de mielina, apresentando como consequência alterações negativas sobre a neurotransmissão. Além disso, o distúrbio na produção energética mitocondrial leva a uma exacerbada compensação metabólica, estimulando a via glicolítica anaeróbica com produção de altos níveis de lactato (VAN DER KNAAP et al., 2003; LINNANKIVI et al., 2004; SERKOV et al., 2004). Embora a causa genética tenha sido identificada em 2007 (SCHEPER et al., 2007), ainda não há cura para esta doença e o tratamento é puramente paliativo.

A reserpina é um alcaloide empregado na indução experimental da doença de Parkinson (DP). Numerosas evidências têm demonstrado uma associação entre a DP e a disfunção mitocondrial caracterizada pela deficiência do complexo I na substância negra parte compacta em autopsias de córtex frontal de indivíduos afetados (SCHAPIRA, 2008). Sabe-se que a deficiência ou inibição parcial do complexo I resulta em aumento da produção mitocondrial de EROS, aumento no estresse oxidativo e danos celulares irreversíveis (BOVERIS; CADENAS; STOPPANI, 1976). A reserpina é um agonista irreversível do VMAT2 (transportador vesicular de monoaminas tipo 2), impedindo o armazenamento vesicular de dopamina. Essa inibição farmacológica resulta em uma diminuição dos níveis de monoaminas, as que auto oxidam no citosol, e como consequência há indução de estresse oxidativo e inibição do complexo I da cadeia respiratória (DUTY; JENNER, 2011).

A tetraidrobiopterina (BH4) é conhecida tradicionalmente como um cofator enzimático obrigatório essencial para a síntese de neurotransmissores monoaminérgicos (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011), óxido nítrico, e para o

metabolismo de ésteres lipídicos e da fenilalanina (MAYER; JOHN; BÖHME, 1990). Entretanto, nosso grupo demonstrou durante a última década que a BH4 desempenha funções fisiológicas adicionais, apresentando propriedades de ativar o funcionamento mitocondrial (CRONIN et al., 2018; DE PAULA MARTINS et al., 2018a, 2018b), de aumentar a resistência contra o estresse oxidativo (GHISONI et al., 2015; DE PAULA MARTINS et al., 2018a), de favorecer um estado anti-inflamatório (LATREMOLIERE et al., 2015; GHISONI et al., 2016), e de estimular processos cognitivos (GHISONI et al., 2016; LATINI et al. 2018). Embora tenham sido descritas estas alterações, ainda não há evidências de que o metabolismo da BH4 esteja prejudicado em deficiências mitocondriais primárias ou adquiridas. Caso essa relação seja identificada, a suplementação com a BH4 poderia se tornar um tratamento visando a melhora na qualidade de vida dos indivíduos afetados pela disfunção mitocondrial. O racional desta proposta é que ao aumentar os níveis intracelulares de BH4, esperar-se que as principais funções antioxidantes, anti-inflamatórias e relacionadas com uma melhora na saúde mitocondrial sejam estimuladas em tecidos com alto conteúdo em mitocôndrias, por exemplo, no cérebro. Embora esta abordagem possa não representar a cura para as DMP, tem o potencial de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos afetados. Essa proposta se torna uma opção viável tendo em vista que a BH4 já é um medicamento aprovado pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (FDA, do inglês *Food and Drugs Administration*) e tem sido administrado em vários milhares de crianças sem ter apresentado efeitos negativos importantes (MUNTAU et al., 2021).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇAS MITOCONDRIAIS PRIMÁRIAS

As DMP são um grupo heterogêneo de doenças genéticas hereditárias, ocorrendo em aproximadamente 1 em 5.000 nascidos vivos (THORBURN, 2004). As DMP são caracterizadas por anormalidades na estrutura e função das mitocôndrias, que são resultantes de mutações, depleção ou deleções do mtDNA ou mutações do nDNA (CHINNERY, 2001). O fenótipo das DMP é amplo e variado, abrangendo desde o envolvimento isolado de sistemas orgânicos em adultos até doença letal multissistêmica em recém nascidos. Assim, a variação no envolvimento sistêmico pode representar um desafio no diagnóstico (GORMAN et al., 2016). Os sintomas das DMP podem incluir fraqueza muscular grave, encefalopatia progressiva, mau funcionamento do fígado, fadiga crônica e neuro degeneração, entre muitas outras (TUPPEN et al., 2010).

Alterações na estrutura e na função mitocondrial podem comprometer o funcionamento da cadeia respiratória, reduzir a produção de energia, alterar o estado redox celular, aumentar a produção de EROS, desregular a homeostase do cálcio e induzir apoptose, provocando desestabilizações no mtDNA. Como consequência, à medida que a produção de energia diminui os tecidos mais oxidativos são afetados, resultando no surgimento de doenças degenerativas principalmente no cérebro, músculo esquelético e coração, que são tecidos com alta demanda energética (WALLACE, 2013).

Até o momento existem apenas tratamentos paliativos e empíricos para as DMP (VU; HIRANO; DIMAURO, 2002). A heterogeneidade genética, a fisiopatologia mal compreendida e a dificuldade na condução de ensaios clínicos representam obstáculos no caminho de um tratamento eficaz. As DMP são condições hereditárias altamente debilitantes com graves consequências para a saúde dos portadores, principalmente naqueles com afeções no sistema nervoso. Assim, o tratamento das DMP é uma necessidade ainda não atendida na medicina moderna.

2.2 A ATIVIDADE MITOCONDRIAL

A mitocôndria é uma organela celular responsável pela produção de energia, está envolvida com a oxidação de nutrientes bem como com a respiração celular; além disso, também atua na regulação dos níveis de cálcio intracelular, regulação do sistema imune inato, morte celular programada, na comunicação celular e na regulação do estresse oxidativo. As mitocôndrias são responsáveis pela produção da maior parte de ATP, que é a principal fonte de energia para as atividades celulares. Na mitocôndria acontece o ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido cítrico, onde as moléculas orgânicas são oxidadas para produção de NADH e FADH₂, que são moléculas essenciais para a cadeia de transporte de elétrons, processo necessário para que aconteça a síntese de ATP. Além disso, as mitocôndrias desempenham um papel na regulação do estresse oxidativo e na resposta a EROS (NELSON; COX, 2014).

A mitocôndria é uma organela envolvida por duas membranas, a membrana externa e a membrana interna, ambas com composição química e estrutural diferentes entre si. A membrana externa é mais permeável que a membrana interna. O espaço entre estas membranas é denominado espaço intermembrana, onde ocorrem reações essenciais ao metabolismo celular. A membrana interna é formada por pregas que se expandem na matriz mitocondrial denominadas cristas mitocondriais (NELSON; COX, 2014). A maquinaria molecular desta organela compreende enzimas presentes na matriz mitocondrial que participam, por exemplo, do ciclo do ácido cítrico e proteínas organizadas na membrana mitocondrial interna que participam da cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória. Os complexos proteicos envolvidos na respiração celular são codificados pelo mtDNA e nDNA como indicado na **Quadro 1** (DI DONATO, 2000).

Quadro 1 - Quantidade de subunidades de cada complexo proteico da cadeia respiratória e do complexo V codificadas pelo DNA mitocondrial (mtDNA) e pelo DNA nuclear (nDNA)

Subunidades	Complexo I	Complexo II	Complexo III	Complexo IV	Complexo V
nDNA	34	4	10	10	11
mtDNA	7	0	1	3	2

Fonte: Adaptado de DI DONATO, 2000.

Como apresentado pelo **Quadro 1**, a cadeia respiratória é composta por quatro complexos enzimáticos multiproteicos distribuídos na membrana mitocondrial interna. Os elétrons oriundos do NADH e do FADH₂ vindos do ciclo do ácido cítrico e de outras reações catalisadas por desidrogenases são transferidos para a cadeia respiratória, sendo o oxigênio molecular o acceptor final. Junto a este processo, ocorre a translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna para o espaço inter membranoso gerando um potencial eletroquímico que é aproveitado como força motriz para a síntese de ATP (VOET; VOET, 1995).

As proteínas que constituem cada complexo respiratório estão embebidas ou ancoradas na membrana mitocondrial interna e possuem vários grupamentos com potencial de oxi-redução (VOET; VOET, 1995; DI DONATO, 2000). Os elétrons, que são advindos principalmente da glicólise e do ciclo do ácido cítrico e também da beta-oxidação de ácidos graxos, são transportados pelo NADH para a primeira enzima do complexo I, a NADH desidrogenase, o qual transfere esses elétrons para a coenzima Q (CoQ). A mitocôndria é, portanto, uma organela vital, desempenhando papel central na produção de energia e no metabolismo celular.

O complexo I é o maior componente proteico presente na membrana mitocondrial interna e é formado por sete unidades codificadas pelo mtDNA e por ao menos por 34 subunidades codificadas pelo nDNA (**Quadro 1**) (VOET; VOET, 1995; DI DONATO, 2000). O complexo II é composto por quatro subunidades proteicas, estando entre elas a enzima dimérica succinato desidrogenase, componente do ciclo do ácido cítrico, sendo todas as proteínas codificadas pelo nDNA (VOET; VOET, 1995; DI DONATO, 2000). O complexo III está arranjado assimetricamente na membrana mitocondrial interna contendo 11 subunidades, onde três delas possuem centros redox utilizados na geração de energia (SARASTE, 1990). O complexo IV consiste de doze ou mais subunidades polipeptídicas (BARRIENTOS et al., 2002). O centro catalítico da enzima é formado por três subunidades maiores que são codificadas pelo mtDNA (CAPALDI, 1990). O complexo V ou ATP sintase é responsável pela síntese de ATP, sendo formado por duas subunidades codificadas pelo mtDNA e pelo menos por doze subunidades codificadas pelo nDNA (SARASTE, 1990).

A mitocôndria é o principal local de produção de EROS em condições fisiológicas, sendo os complexos I e III da cadeia respiratória os principais locais de produção de espécies reativas (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979). A produção de EROS é um mecanismo necessário em vários processos biológicos, entre eles a

sinalização celular, contração muscular e ativação do sistema imune (KANEKO; BABA; MATSUO, 2001). Entretanto, quando os níveis de EROS forem maiores que a capacidade de defesa antioxidante celular, a geração de EROS se torna prejudicial ao organismo, podendo causar danos celulares significativos resultando em morte celular. Para contrabalancear a produção de EROS, a mitocôndria possui sistemas de defesa antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e peroxidase, peroxirredoxinas, e os compostos solúveis glutathione, creatina, e nicotinamida, entre outros (OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001; DRÖGE, 2002). A excessiva produção de EROS pode também induzir a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados de membrana, muito concentrados nas células do sistema nervoso central, levando a múltiplos produtos tóxicos de peroxidação lipídica e disfunção celular (POLI; SCHAUR, 2000).

2.3 A DOENÇA LBSL

A leucoencefalopatia relacionada ao DARS2, também chamada de LBSL, é uma doença neurodegenerativa definida como rara pela incidência que possui, com apenas 127 casos relatados no mundo (ORPHANET, 2023), e que apresenta um amplo espectro fenotípico. A LBSL apresenta espasticidade que progride lentamente e se inicia na infância ou na adolescência, ataxia cerebelar e disfunção na coluna dorsal (VAN BERGE et al., 2014). Formas graves da doença com início pré-natal e/ou na primeira infância ocorrem com microcefalia profunda e morte precoce (STEENWEG et al., 2012; MARTIKAINEN; ELLFOLK; MAJAMAA, 2013).

A LBSL é causada por mutações no gene DARS2 que codifica a aspartil-tRNA sintetase mitocondrial (mt-AspRS). A mt-AspRS é sintetizada no citosol e transportada para as mitocôndrias, onde é responsável por catalisar a ligação entre o aminoácido aspártico e o RNA transportador (tRNA) correspondente durante o processo de síntese de proteínas; esta etapa é um pré-requisito necessário na tradução do mRNA mitocondrial em proteínas funcionais (SCHEPER et al., 2007).

A mt-AspRS pertence à categoria de enzimas aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs), as quais constituem um conjunto de enzimas codificadas pelo núcleo, responsáveis por assegurar a correta tradução do código genético. Essas enzimas unem cada um dos 20 aminoácidos à sua respectiva molécula de tRNA. As aaRSs citosólicas fornecem complexos aminoacil-tRNA para a síntese de proteínas,

enquanto as aaRSs mitocondriais são transportadas para a matriz mitocondrial, onde desempenham seu papel canônico ao carregar aminoácidos para as moléculas de tRNA codificadas pelo genoma mitocondrial (SISSLER; GONZÁLEZ-SERRANO; WESTHOF, 2017).

As mt-AspRSs, ao serem sintetizadas no citosol, possuem sequências de sinal mitocondrial na extremidade amino-terminal, direcionando-as para serem importadas para as mitocôndrias. A sequência sinal é reconhecida por um complexo proteico especializado localizado na membrana externa da mitocôndria, o complexo chamado translocase da membrana externa mitocondrial (TOM). Na membrana interna, a mt-AspRS encontra o complexo de translocase da membrana interna (TIM), que facilita a passagem da enzima para a matriz mitocondrial. No interior da matriz mitocondrial, a mt-AspRS passa por processos de maturação e ativação para se tornar funcional. Na matriz mitocondrial, a mt-AspRS reconhece especificamente o tRNA que transporta o aminoácido aspartato e catalisa a reação de ligação. Essa molécula formada pelo aminoácido e seu tRNA é transportada para o ribossomo durante a síntese proteica na mitocôndria. Dessa forma, a mt-AspRS desempenha um papel fundamental na síntese de proteínas dentro da mitocôndria, contribuindo para a formação de cadeias polipeptídicas que são essenciais para as funções mitocondriais (ALBERTS et al., 2017).

Existem ao menos cinquenta mutações em DARS2 identificadas em todo o mundo (MUTHIAH et al., 2021), resultando em uma apresentação clínica heterogênea. A maioria dos indivíduos LBSL relatados abriga mutações heterozigóticas em DARS2, sendo uma delas uma mutação no local de splice em um hotspot no íntron 2, que resulta na exclusão do éxon 3, levando a uma proteína não funcional, truncada e com mudança de matriz de leitura. Essas mutações do intron 2 podem resultar na expressão de mtAspRS normais e anormais (SCHEPER et al., 2007). Embora estas mutações no íntron 2 produzam alguma proteína DARS2 funcional, quando combinadas com uma segunda mutação deletéria, as proteínas normais se tornam insuficientes, ocasionando a doença. Assim, a expressão do mtAspRS funcional é completamente dependente do alelo com a mutação do íntron 2 (SCHEPER et al., 2007).

O DARS2 é indispensável para o desenvolvimento embrionário inicial, como demonstrado pela letalidade embrionária de camundongos nocautes para esse gene (DOGAN et al., 2014). A deficiência em DARS2 exclusivamente em neurônios de

camundongos resulta em fenótipos graves e progressivos, incluindo hiperatividade, degeneração concomitante no córtex, hipocampo e corpo caloso, e marcada neuroinflamação. Uma das características deste distúrbio é a degeneração da bainha de mielina, apresentando como consequência falhas na neurotransmissão. Além disso, o lactato está elevado na maioria dos indivíduos com LBSL, tanto no plasma quanto no cérebro (VAN DER KNAAP et al., 2003). O tratamento existente para essa doença é direcionado apenas aos sintomas.

2.4 INDUÇÃO QUÍMICA DE DEFICIÊNCIA MITOCONDRIAL DA RESPIRAÇÃO CELULAR; MODELO EXPERIMENTAL DE DP

A reserpina é um alcaloide isolado das raízes da planta *Rauwolfia serpentina* empregado na indução experimental da DP. A reserpina simula alguns sintomas motores da DP como bradicinesia, rigidez muscular e tremor de repouso, além de prejuízos cognitivos como prejuízo de memórias implícitas e operacionais, demência e depressão (DUVOISIN; MARSDEN, 1974; SILVA et al., 2002). A reserpina é um agonista irreversível do VMAT2, impedindo o armazenamento vesicular de monoaminas (DUTY; JENNER, 2011). O VMAT2 é uma proteína transmembranar encontrada nas vesículas sinápticas das terminações nervosas, sua função principal é bombear monoaminas, como a dopamina, serotonina e norepinefrina, para dentro das vesículas, onde são armazenados até a liberação durante a transmissão sináptica. A reserpina se liga ao sítio ativo do VMAT2 e impede que a proteína transporte eficientemente as monoaminas para as vesículas sinápticas. Assim as monoaminas permanecem no citoplasma, sendo rapidamente oxidadas pela monoamina oxidase B, o que causa a depleção de neurotransmissores, como a dopamina, no sistema nervoso (DUTY; JENNER, 2011).

No contexto da DP, a depleção de dopamina nas vesículas sinápticas é particularmente relevante. A dopamina, é vital para a regulação do movimento e da função motora e sua deficiência pode levar aos sintomas observados na doença de Parkinson. Do ponto de vista experimental, baixas doses de reserpina (0,1-1,0 mg/kg) modelam prejuízos cognitivos e olfatórios em roedores, enquanto doses mais elevadas (5 mg/kg) causam prejuízos motores (PREDIGER; DA CUNHA; TAKAHASHI, 2005; AGUIAR et al., 2009).

Numerosas evidências têm demonstrado uma associação entre a DP e a disfunção mitocondrial caracterizada pela deficiência do complexo I na parte compacta da substância negra em autopsias de córtex frontal de indivíduos afetados (SCHAPIRA, 2008). A relação direta entre disfunção mitocondrial e DP veio da descrição post-mortem da deficiência do complexo I na substância negra de pacientes com DP (SCHAPIRA, 1989). Posteriormente, a deficiência do complexo I também foi observada no músculo esquelético e nas plaquetas, existindo uma diminuição das proteínas do complexo I na substância negra de indivíduos com DP (BINDOFF et al., 1989). Com isso, a administração de reserpina resulta em uma condição de deficiência mitocondrial com prejuízo na atividade do complexo I da cadeia respiratória.

2.5 O METABOLISMO DA BH4

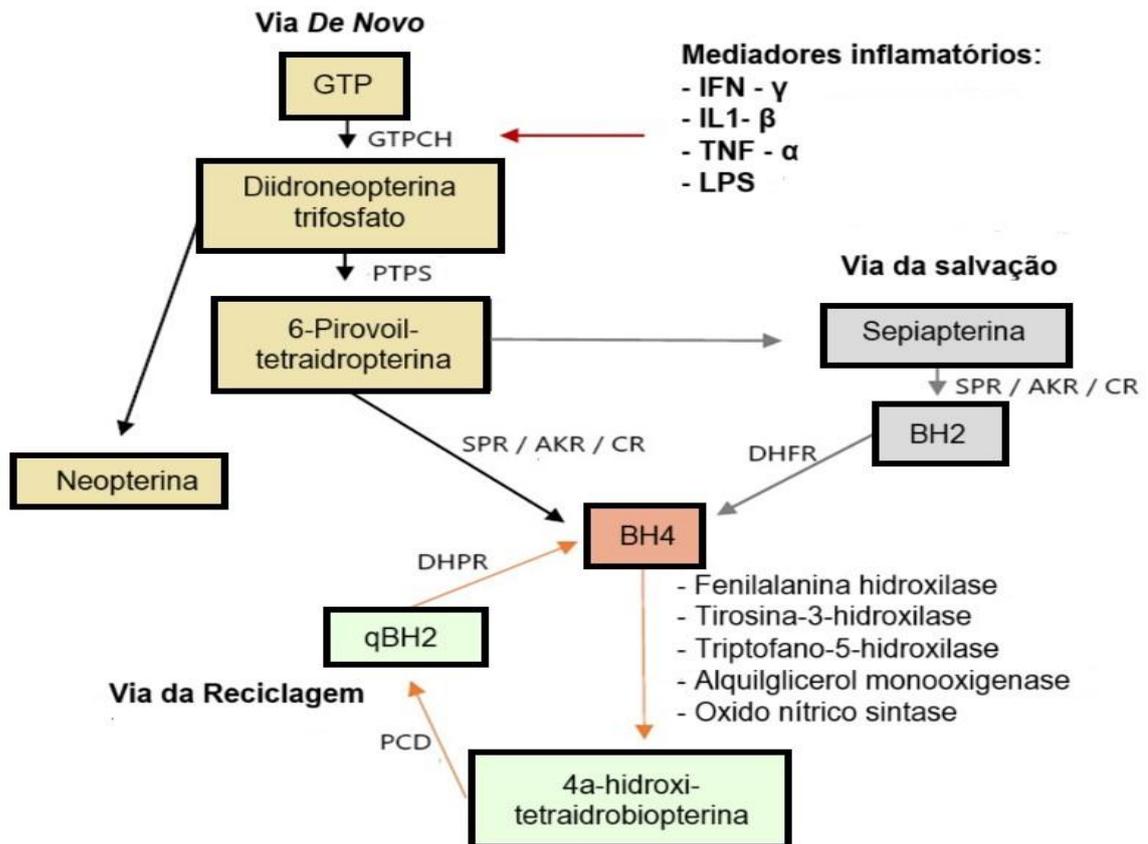
A BH4 é uma pteridina que atua como cofator enzimático. A BH4 é produzida em todos os tecidos do corpo humano e é cofator enzimático obrigatório para a produção dos neurotransmissores serotonina e dopamina e de ON, para o metabolismo de fenilalanina e de éteres lipídicos (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011). O estado redox deste anel de pteridina tem efeitos profundos na química, atividade espectral e biológica, existindo totalmente oxidada (biopterina), parcialmente reduzida (BH2), ou a forma totalmente reduzida (BH4) (CRABTREE; CHANNON, 2011).

As concentrações intracelulares de BH4 são estritamente controladas por um metabolismo complexo através da ação das vias de síntese *de novo*, via de salvação e via de reciclagem (**Figura 1**) (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011). A via da síntese *de novo* gera BH4 a partir de guanosina trifosfato por meio de uma cascata enzimática de três etapas, começando com a enzima limitante guanosina trifosfato ciclohidrolase (GTPCH), seguida pela 6-piruvilil tetraidropterina sintase (PTPS) e sepiapterina redutase (SPR) (LEVINE et al., 1990; THÖNY; AUERBACH; BLAU, 2000 para uma revisão TUANY 2023).

A enzima GTPCH é controlada transcricionalmente por estímulos inflamatórios como interferon- γ (IFN- γ), interleucina 1- β (IL1- β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento do nervo (NGF) e peróxido de hidrogênio (BAUER et al., 2002). A atividade de GPTCH pode ser estimulada em até 100 vezes durante condições inflamatórias em células imunes, enquanto a atividade das enzimas PTPS e SR são apenas minimamente moduladas (KANEKO et al., 2003). À vista

disso, a PTPS torna-se a enzima limitante na biossíntese *de novo* de BH4 durante processos inflamatórios (WERNER-FELMAYER et al., 1993).

Figura 1 - Vias metabólicas envolvidas na produção da tetraidrobiopterina (BH4)



Legenda: A via de síntese *de novo*, a de salvação e a de reciclagem. IL-1 β : interleucina-1 beta; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; INF- γ : interferon-gama; IL-6: interleucina-6; LPS: lipopolissacarídeo; GTP: guanosina trifosfato; GTPCH: guanosina trifosfato cicloidrolase; PTPS: 6-piruvilil tetraidropterina sintase; SPR: sepiapterina redutase; AKR: aldo-ceto redutase; CR: carbonil redutase; BH2: 7,8-diidrobiopterina; DHFR: diidrofolato redutase; qBH2: quinoide diidrobiopterina; PCD: 4-alfa-carbinolamina desidratase; DHPR: diidropteridina redutase; BH4: 5,6,7,8-tetraidrobiopterina.

Adaptado de (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011).

A via de salvação gera BH4 usando BH2 ou sepiapterina como substratos. A enzima SPR catalisa a conversão de sepiapterina em BH2, que é então convertida à BH4 pela enzima diidrofolato redutase (DHFR) (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011). Apesar de essa via não ser totalmente compreendida, a SPR e a DHFR parecem ser as principais enzimas participantes (HIRAKAWA et al., 2009; WERNER; BLAU;

THÖNY, 2011). Tem sido proposto também que existem outras enzimas inespecíficas que podem participar da via da salvação, as aldose redutases e carbonil redutases (HIRAKAWA et al., 2009). Dessa maneira, essas enzimas podem converter a 6-piruvil tetraidrobiopterina em intermediários instáveis que formarão diretamente a BH4 e/ou irão participar na formação não enzimática de sepiapterina, e após em BH2, que será posteriormente convertida em BH4 pela DHFR (LATREMOLIERE et al., 2015). Logo, na via de salvação é possível a síntese BH4 mesmo na ausência de atividade da enzima SPR (HIRAKAWA et al., 2009). Na via de reciclagem, após a BH4 participar como cofator enzimático, o intermediário 4a-hidroxi-tetraidrobiopterina é formado e passa por um mecanismo clássico de desidratação formando quinonoide diidrobiopterina, que é novamente reduzida para BH4 pela enzima diidropterina redutase (THÖNY; AUERBACH; BLAU, 2000).

Diante da complexidade da via biossintética da BH4 e dos mecanismos envolvidos na regulação do fluxo metabólico, o nosso grupo de pesquisa postulou uma década atrás que a BH4 deveria ter outras funções celulares essenciais. Um dos trabalhos desenvolvidos por nosso grupo mostrou que células imunes com deficiência na síntese de BH4 (animal nocaute para o gene que codifica para GTPCH – enzima limitante do fluxo de síntese de BH4 –, ou células tratadas com SPRi3 e QM385 – inibidores farmacológicos da síntese de BH4 –) apresentaram prejuízo na expansão celular e infiltração nos tecidos por falhas na produção de ATP. Essa disfunção mitocondrial foi caracterizada por aumento de EROS na mitocôndria, diminuição da respiração e do ferro mitocondrial e aumento nas concentrações de lactato e piruvato (CRONIN et al., 2018b). A reposição das concentrações intracelulares de BH4, restaurou a síntese de ATP e a resistência contra o estresse oxidativo. Identificamos ainda que o provável sítio de interação da BH4 é entre os complexos III e IV da cadeia respiratória, em nível do citocromo *c* (CRONIN et al., 2018b). Outro estudo em camundongos com deficiência no gene *Parkin*, demonstrou que a via *de novo* da BH4 não foi regulada positivamente na presença de LPS, que é um estímulo bem conhecido para a sua ativação; houve um aumento da expressão da SPR, sugerindo compensação pela via de resgate. Além disso, o cenário inflamatório aumentou a quantidade de mitocôndrias e resultou em mitocôndrias de menor tamanho e de distribuição perinuclear (DE PAULA MARTINS et al., 2018b).

Nosso grupo também demonstrou a ação antioxidante do metabolismo da BH4 em células nervosas humanas sob estímulos inflamatórios. Foi observada uma

inibição significativa da ativação do inflamassoma em astrócitos humanos pré-condicionados com neopterinina (subproduto da via de síntese da BH4), quando expostos a LPS. Foi demonstrada uma redução da expressão ou conteúdo de IL-1 β , caspase-1 e ASC (proteína adaptadora apoptótica), componentes do inflamassoma NLRP3. A neopterinina induziu a translocação nuclear do fator de transcrição Nrf-2, e liberação das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-1, inibindo a ativação do inflamassoma. Esses dados demonstram o papel essencial da neopterinina em processos inflamatórios (DE PAULA MARTINS et al., 2018a).

Também, foi observado por nosso grupo que a neopterinina facilitou os processos cognitivos ao induzir um estado antioxidante/anti-inflamatório e por facilitar a geração de processo de potencialização de longa duração em camundongos (LATINI 2018). A administração de neopterinina facilitou a aprendizagem aversiva em camundongos adultos selvagens e em camundongos idosos nulos para IL-10, expostos a LPS. Os efeitos protetores da neopterinina nas deficiências de memória induzidas pelo LPS também foram relacionados a uma produção significativamente reduzida de IL-6 cerebral. Esses achados configuram a primeira evidência que mostra a propriedade de intensificador cognitivo da neopterinina (GHISONI et al., 2016). O papel da BH4 no estado anti-inflamatório também foi demonstrado em camundongos tratados com adjuvante completo de Freund, um composto que estimula resposta imune. Nesses animais a inibição da enzima SPR, parte da via de síntese da BH4, in vivo, reduziu o inchaço inflamatório e a hipersensibilidade à dor (LATREMOLIERE et al., 2015).

Ademais, foi observado pelo nosso grupo que em camundongos e ratos que receberam administração intracerebroventricular de BH4 houve uma facilitação na aquisição e consolidação de memória aversiva. A administração de BH4 facilitou a memória aversiva ao ativar a neurotransmissão glutamatérgica e a atividade retrógrada do ON. Também foi demonstrado que a BH2 pode ser convertida em BH4 ativando a via de salvamento da BH4 no hipocampo sob condições fisiológicas. Esta é a primeira evidência que mostra que a BH4 aumenta a memória aversiva e que a via de recuperação da BH4 está ativa no hipocampo (LATINI et al., 2018).

Além disso, evidências da literatura demonstraram que a deficiência de BH4 afeta a transcrição do mtDNA, compromete a biogênese mitocondrial e a respiração mitocondrial (menor consumo de oxigênio e síntese de ATP com perda do potencial de membrana mitocondrial) e promove a formação de EROS em cardiomiócitos de

camundongos nocautes para SPR. Porém, após suplementação com BH4, esses efeitos negativos na fisiologia mitocondrial foram normalizados (KIM et al., 2019). Foram observados resultados semelhantes em neurônios com deficiência na produção de BH4. Foi observada uma despolarização mitocondrial, aumento de EROS, depleção de ATP e morte por necrose. Todos os efeitos deletérios foram neutralizados quando os níveis de BH4 foram restituídos (DELGADO-ESTEBAN; ALMEIDA; MEDINA, 2002).

Somando-se a isso, foi demonstrado que a BH4 é responsável por induzir mitofagia em tecidos com alta demanda energética (KWAK et al., 2011). Camundongos deficientes em SPR mostraram comprometimento na iniciação da mitofagia no cérebro, fígado, músculo e pulmão, mas que foi restabelecida após normalizar as concentrações intracelulares de BH4 (KWAK et al., 2011). Sendo a mitofagia um mecanismo crucial para a remoção de mitocôndrias disfuncionais, se torna mais evidente a relevância do metabolismo da BH4 na funcionalidade mitocondrial (RAMBOLD; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2011).

Dessa forma, já existem evidências disponíveis na literatura mostrando que a deficiência em BH4 resulta em disfunção mitocondrial. Entretanto, ainda não há evidências de que o metabolismo da BH4 esteja prejudicado nas DMP e caso essa relação seja demonstrada a suplementação com a BH4 poderia se tornar um possível tratamento, visando uma melhora da qualidade de vida dos indivíduos afetados por essas doenças. Considerando que as mitocondriopatias primárias são condições hereditárias altamente debilitantes com graves consequências para a saúde dos portadores, principalmente no sistema nervoso, não havendo cura nem medidas terapêuticas eficazes para o tratamento, novas estratégias são necessárias e é plausível propor que a suplementação com BH4 pode ser uma inovadora estratégia para aumentar a função mitocondrial residual. Ao aumentar os níveis intracelulares de BH4 é esperado que as principais funções antioxidantes, anti-inflamatórias e relacionadas com uma melhora na saúde mitocondrial sejam estimuladas principalmente no cérebro, tecido com alto conteúdo em mitocôndrias e um dos principais afetados nas DMP. Embora esta estratégia não represente uma cura definitiva, ela apresenta o potencial de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos afetados. Essa proposta se torna uma opção viável tendo em vista que a BH4 já é um medicamento aprovado pelo FDA e tem sido administrado para tratamento de

fenilcetonúria desde 2007 em vários milhares de crianças sem ter apresentado efeitos negativos importantes (MUNTAU et al., 2021).

3 HIPÓTESE

O metabolismo da BH4 se encontra prejudicado em disfunções mitocondriais primárias e adquiridas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o metabolismo da BH4 em sistemas que apresentem disfunção mitocondrial primária (genética) ou adquirida.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o efeito da administração de reserpina sobre o metabolismo e dinâmica mitocondrial no músculo esquelético de camundongos;
- b) Quantificar os níveis da BH4 em fluídos biológicos e tecido cerebral de animais tratados com reserpina;
- c) Caracterizar a disfunção mitocondrial provocada pela deficiência genética em DARS2 em fibroblastos obtidos de indivíduos acometidos pela doença;
- d) Analisar a expressão diferencial de genes em fibroblastos obtidos de indivíduos acometidos pela deficiência em DARS2;
- e) Confirmar e complementar os resultados obtidos da análise do transcriptoma mediante uma análise mais detalhada do metabolismo da BH4 em fibroblastos obtidos de indivíduos acometidos pela deficiência em DARS2.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

O presente trabalho empregou camundongos suíços adultos machos (com peso de 45 a 50 g) obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Os animais foram mantidos em caixas plásticas individuais a uma temperatura ambiente de aproximadamente 22 ± 1 °C, sob um ciclo de claro-escuro de 12:12 h e com acesso livre a água e ração para roedores (Nuvital, PR, Brasil).

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (PP00760/CEUA) da UFSC, o qual por sua vez é regido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.1.1 Experimentação animal com administração de reserpina

O desenho experimental empregando reserpina e a coleta e processamento de tecidos para posterior análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi desenvolvido no Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX) da UFSC pela Dra. Débora da Luz Scheffer. A reserpina foi administrada em duas doses de 1 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) com intervalo de 48 h. Os animais receberam um volume de 0,1 mL por cada 10 g de massa corporal. A reserpina foi diluída em ácido acético glacial 0,1 % e em solução cloreto de sódio 0,9 % (veículo; n=3). Os animais controles receberam apenas ácido acético glacial 0,1 % preparado em solução de cloreto de sódio 0,9 % (veículo; n=3). Após a eutanásia o sangue foi coletado e a dissecação para obtenção do estriado cerebral e do músculo esquelético para quantificação da morfometria mitocondrial e do número de mitocôndrias foi realizada. O músculo coletado foi o músculo esquelético do quadríceps, um grupo de quatro músculos localizados na face anterior da coxa (vasto lateral, vasto medial, reto femoral e vasto intermédio). O músculo quadríceps é composto por uma grande quantidade de fibras de contração lenta ou tipo I, contendo um alto número de mitocôndrias (JOHNSON et al., 1973).

5.1.2 Coleta e processamento de amostras biológicas

5.1.2.1 *Plasma*

O sangue dos animais foi coletado em tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e centrifugado a $700 \times g$ por 10 min para a obtenção do plasma. O plasma foi precipitado com ácido tricloroacético (TCA) 5 %, contendo ditioeritritol (DTE) 6,5 mM e centrifugado a $16.000 \times g$ durante 10 min a 4 °C. As amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C para quantificação da BH4.

5.1.2.2 *Urina*

Para a coleta de urina, os animais foram colocados em umacrílico com divisórias e logo abaixo folha de plástico não absorvente. A urina foi coletada por um período de aproximadamente 1 h e armazenada em microtubos. A urina foi precipitada pela adição de um volume de TCA 5 %, contendo DTE 6,5 mM e centrifugadas a $16.000 \times g$ durante 10 min a 4 °C. As amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C para quantificação da BH4.

5.1.2.3 *Estriado*

O estriado dos animais foi homogeneizado e precipitado pela adição de TCA 5 %, contendo DTE 6,5 mM e o homogenatos foi centrifugado a $16.000 \times g$ durante 10 min a 4 °C. As amostras foram armazenadas em freezer a -80 °C para a quantificação da BH4.

Para a mensuração da atividade do complexo I da cadeia respiratória, o estriado foi homogeneizado em 20 volumes de tampão SETH, pH 7,4 (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, Tris 10 mM e heparina 50 UI/mL). Os homogenatos foram centrifugados a $800 \times g$ por 10min a 4°C, o pellet foi descartado e os sobrenadantes foram armazenadas em freezer a -80 °C.

5.1.2.4 *Músculo esquelético*

O músculo esquelético quadríceps dos animais foi removido e imediatamente preparado para o procedimento de MET e posterior análise da morfometria mitocondrial como indicado abaixo.

5.2 AMOSTRAS HUMANAS

Todos os procedimentos baseados em tecidos humanos foram aprovados pelo Conselho de Revisão Institucional (IRB) do Children's Hospital of Orange County (CHOC; IRB #130990). Os indivíduos foram diagnosticados e acompanhados pela Divisão de Distúrbios Metabólicos do CHOC Children's Hospital of Orange, Orange, CA, Estados Unidos. Foram incluídos no trabalho os indivíduos abaixo descritos que apresentaram duas mutações no gene DARS2 (**Tabela 1**). Uma dessas mutações já tinha sido descrita na literatura, enquanto a segunda mutação foi descrita pela primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa (HUANG et al., 2024). Ambos os afetados apresentaram sinais compatíveis com a doença LBSL, apresentando alterações na ressonância magnética (MRI) e na espectroscopia do cérebro.

5.2.1 Caracterização dos indivíduos afetados pela deficiência em DARS2

Foram incluídos dois indivíduos de uma mesma família (irmãos) com duas mutações no gene DARS2. Os indivíduos apresentam a mutação c.492 + 2 T > C, já relatada anteriormente no gene DARS2. Ademais, os indivíduos apresentam uma mutação relatada pela primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa, por sequenciamento de Sanger, uma nova variante c.228-17C> G no *hotspot* do íntron 2 (HUANG et al., 2024). No momento do diagnóstico, o **indivíduo 1** (aqui denominado de sintomático) apresentava 8 anos de idade, sexo masculino, e fruto de uma gravidez tripla com prematuridade. Até o diagnóstico o indivíduo 1 teve histórico de hidrocefalia, e estudos de MRI anormais. O **indivíduo 2** é irmão do indivíduo 1 e no momento do diagnóstico apresentava 4 anos de idade, sexo masculino, não possuía histórico de trauma craniano e também apresentava imagens de MRI anormal, entretanto esse indivíduo era assintomático. Ambos apresentaram níveis baixos de RNA mensageiro do gene DARS2, ausência completa da proteína DARS2 e anormalidades na massa branca supraventricular, periventricular e na medula espinhal. O **controle** utilizado nestes estudos correspondeu a um dos trigêmeos fruto da mesma gestação do

indivíduo 1, do sexo masculino. O indivíduo não apresentava mutações no gene DARS2 e foi considerado como o **controle ideal** visto que apresenta toda a informação genética e exposição ambiental durante o desenvolvimento (gestação) do indivíduo 1 com exceção da mutação em DARS2.

5.2.2 Material biológico obtido dos indivíduos com deficiências em DARS2 e do controle

Foram coletadas biópsias de pele de 3 mm por punção dos indivíduos para preparação de culturas primárias de fibroblastos. Esta coleta foi realizada no hospital CHOC por profissional especializado como previamente descrito pelo grupo de pesquisa do coorientador deste trabalho Dr. José Abdenur (STILES et al., 2016).

5.2.3 Fibroblastos

Os fibroblastos primários foram cultivados em frascos tratados com meio de cultura Minimal Essential Medium (Gibco, Cat. 32.571.036) suplementado com 100 µM de aminoácidos não essenciais (Gibco, Cat. 11.140.050), 100 µg/mL Primocin (InvivoGen, Cat. ant-pm-1) e 15 % de soro fetal bovino (SFB) (HyClone™ FetalClone™ III Serum, Cytiva, Cat. SH30109.03). Uma vez estabelecidas as culturas celulares, os fibroblastos foram mantidos em meio Dulbecco modificado (Gibco, Cat.11966025) suplementado com glicose 5 mM (Sigma, Cat. G8644), 100 µM de aminoácidos não essenciais (Gibco, Cat.11.140.050), piruvato de sódio 1 mM (Gibco, Cat. 11.360.070), antibiótico/antimicótico (Gibco, Cat. 15.240.062) e 10 % de SFB a 37 °C (meio de crescimento) em 5 % de CO₂ a 37 °C. Os estoques de células foram criopreservados em nitrogênio líquido em uma solução com 20 % de SFB e 10 % de dimetilsulfóxido (Sigma, Cat. D2650). Também foram cultivadas células do indivíduo controle. Nos experimentos sempre foram empregadas culturas com similar número de passagens e taxa de crescimento. Os fibroblastos foram utilizados para a análise da atividade enzimática dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória e da GTPCH, e para a extração de DNA e de RNA.

5.2.4 Processamento de amostras biológicas humanas

5.2.4.1 *Para quantificação da atividade dos complexos da cadeia respiratória*

As células foram suspendidas em tampão SETH, pH 7,4 (sacarose 250 mM, EDTA 2 mM, Trisma base 10 mM, heparina 50 UI/mL) e homogeneizadas. Após, passaram por processo de congelamento e descongelamento por três vezes e foram centrifugadas a 3.500 x *g* por 10 min a 4°C. O pellet foi descartado e os sobrenadantes foram armazenadas em freezer a -80 °C.

5.2.4.2 *Para atividade enzimática*

Os fibroblastos cultivados foram homogeneizados em 150 µL de tampão Tris-HCL 50 mM pH 7,5, contendo DTE 1,0 mM e coquetel inibidor de protease (1 comprimido / 10 mL de tampão; completo, ULTRA, Mini, sem EDTA, EASYpack; Roche, EUA). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x *g* por 5 min a 4 °C para a remoção de sais e pteridinas. A seguir o sobrenadante foi transferido para colunas de dessalinização Zeba (40k MWCO, Thermo Sci, IL, EUA). Em seguida, três ciclos de congelamento e descongelamento foram aplicados aos extratos a fim de permitir a dissociação completa da proteína reguladora de GTPCH (a associação com proteína reguladora inibie a atividade da GTPCH (TATHAM et al., 2009).

5.2.4.3 *Extração do material genético*

O DNA foi extraído dos fibroblastos utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen Cat. 69504) e foi armazenado em freezer -80 °C para posterior análise de polimorfismos do gene *GCH1*. O RNA foi extraído usando o kit PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Cat.12–183-018A, Waltham, EUA) e as amostras foram tratadas com PureLink™ DNase Set (Invitrogen, Cat. 12.185.010) para produzir RNA puro. Foram utilizados 2 µg de RNA para a transcrição reversa usando o kit de síntese de cDNA Superscript VILO (Invitrogen, Cat.11.754.050). Todos os procedimentos foram realizados seguindo as orientações dos fabricantes. As amostras de cDNA foram

utilizadas para análise da expressão do gene *GCH1* e foram sequenciadas para análise do transcriptoma.

5.3 MÉTODOS

5.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras de músculo esquelético foram submetidas a MET. A preparação das amostras foi realizado pela Dra. Debora Scheffer no *Centro de Microscopia Eletrônica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina*, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Lucia De Paul. Para coletar o músculo esquelético para análise por MET os animais foram perfundidos com cloreto de sódio 0,9 % e o músculo esquelético quadríceps foi removido e imediatamente fixado em solução Karnovsky conformada por formaldeído 4 %, glutaraldeído 2 % e tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3, permanecendo durante 4 h a 4 °C. A seguir, foram realizadas três lavagens de 30 min com água destilada e em seguida as peças ficaram por 2 h em um rotor em movimento a temperatura ambiente em tampão cacodilato contendo tetróxido de ósmio 1 %, sendo lavadas novamente em água destilada após esse procedimento. Na etapa seguinte as peças foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50 e 75 % por 5 min; 90 % por 10 min; e 3 x de 100 % por 15 min). Em seguida foi feita uma inclusão com araldita e acetona 100 % (1:1) e deixado por 3 h em um rotor em movimento a temperatura ambiente. Foi realizada uma pré-inclusão com araldita pura durante 6 h em temperatura ambiente e as peças foram novamente incluídas em araldita e colocadas em estufa a 60 °C por 48 h como previamente descrito pelo grupo da Profa. De Paul (DE PAUL et al., 2000). Foram realizados cortes semifinos (240-280 nm) para localização da área de interesse, e após os cortes finos (90-120 nm), realizados com uma navalha de diamante em um ultramicrotomo JEOL JUM-7 (Nikon, Tóquio, Japão). Os cortes finos foram contrastados com acetato de uranilo e citrato de chumbo 1 % por 1 min, para serem analisados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Leo 906 E, equipado com câmera digital Megaview III (Oberkochen, Alemanha).

5.3.2 Quantificação da BH4

Os níveis de BH4 foram determinados por cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC) com detecção eletroquímica. A medição foi realizada em um HPLC (Alliance e2695, Waters, MA, EUA) usando uma coluna Waters Atlantis dC18, de fase reversa (4,6 × 250 mm; partícula de 5 µm), com vazão ajustada em 0,7 mL/min e uma eluição isocrática de NaH₂PO₄ 6,5 mM, ácido cítrico 6 mM, octil sulfato de sódio 1 mM, ácido dietilenotriaminopentacético 2,5 mM, DTE160 µM e acetonitrila 12 %, pH 3,0. A temperatura do compartimento da coluna foi regulada para 35 °C. A identificação e quantificação de BH4 foram realizadas acoplando ao HPLC um detector eletroquímico (módulo 2465, Waters, MA, EUA) com tensão ajustada em +450 mV.

5.3.3 Atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória

A atividade do complexo I foi mensurada através da redução do ferricianeto dependente de NADH em um comprimento de onda de 420 nm (LATINI et al., 2005). A atividade do complexo II foi mensurada através da redução do 2,6-dinitrofenolindofenol em 600 nm (LATINI et al., 2005). O complexo IV foi determinado pela mensuração da oxidação do citocromo *c* lido a 550 nm (LATINI et al., 2005). As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram mensuradas utilizando-se um espectrofotômetro com temperatura controlada (Infinite® 200 PRO TECAN, Männedorf, Suíça). Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

5.3.4 Morfometria mitocondrial

Para quantificação do conteúdo, tamanho, e parâmetros de morfologia mitocondrial foram analisados 30 campos por amostra. As medidas de forma e tamanho mitocondrial foram obtidas usando o programa Image J (versão 1.42q, National Institutes of Health, Bethesda, MD) traçando manualmente os contornos das mitocôndrias. Foram analisadas apenas as mitocôndrias com contornos claramente discerníveis de mitocôndrias subsarcolemais (SS) e intermiofibrilares (IMF) nas micrografias de MET.

O tamanho das mitocôndrias foi analisado pela mensuração da área de superfície (μm^2) e pelo perímetro (μm). A ramificação das mitocôndrias foi analisada pelo índice de Feret, fator de ramificação, e aspecto mitocondrial. O índice de Feret representa a maior distância (μm) entre dois pontos dentro de uma determinada mitocôndria. O fator de ramificação $[(\text{perímetro})^2 / (4 \times \pi \times \text{área})]$ reflete a complexidade e o aspecto ramificado das mitocôndrias. O aspecto mitocondrial $[(\text{eixo maior}) / (\text{eixo menor})]$, reflete a relação comprimento-largura da mitocôndria. A forma circular das mitocôndrias foi analisada utilizando a circularidade $[4 \times \pi \times (\text{surface área} / \text{perímetro}^2)]$, e a redondeza $[4 \times (\text{área}) / \pi \times \text{eixo maior}^2]$, que são índices bidimensionais de esfericidade; esferóides perfeitos seriam descritos por valores de 1.

5.3.5 Sequenciamento de RNA dos fibroblastos humanos

O sequenciamento foi realizado contratando os serviços da Universidade de Califórnia, Irvine (Irvine, Estados Unidos). O procedimento foi realizado na plataforma Illumina NovaSeq 6000 e as bibliotecas foram construídas usando o kit Illumina TruSeq Stranded Total RNA (50 million reads, S4, *paired-end*, 100 pb). Para construção das bibliotecas de sequenciamento, as moléculas de cDNA foram fragmentadas e foram adicionados adaptadores moleculares que contém segmentos que agem como pontos de referência. Em seguida os fragmentos modificados foram dispostos em uma célula que contém nano poços com oligonucleotídeos, que atuam como âncoras para os adaptadores moleculares. Com a ancoragem dos adaptadores inicia-se a fase de formação de *clusters*. Essa etapa produz milhares de cópias de cada fragmento de cDNA introduzido. Após essa etapa são inseridos *primers* e nucleotídeos modificados no chip de sequenciamento, sendo que os nucleotídeos possuem um bloqueador reversível de fluorescência que impede a DNA polimerase de adicionar mais de um nucleotídeo por vez ao fragmento de cDNA. A cada nucleotídeo adicionado ao fragmento, o chip é fotografado e a base que foi adicionada é determinada por computador (MEYER; KIRCHER, 2010). Ao fim do sequenciamento cada fragmento resulta em duas leituras, uma leitura referente à fita *forward* e outra à fita *reverse*.

5.3.5.1 *Análise da qualidade e filtragem*

Para a manipulação dos dados sequenciados foi utilizado um servidor de 88 cores de processamento cedido pelo Núcleo de Bioinformática da UFSC (<https://nubioinfo.ufsc.br>) e acessado remotamente por processamento com Docker. As sequências resultantes do sequenciamento, em arquivos FastQ, tiveram a qualidade analisada com a utilização do programa FastQC (ANDREWS, 2010). As sequências de baixa qualidade foram filtradas utilizando a ferramenta Trimmomatic versão 0.38 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), de acordo com o *phred score*, que representa a chance de ocorrência de *misreads*, ou leituras errôneas, em cada nucleotídeo da leitura. Foram retiradas as *reads* com baixa qualidade e tamanho inferior a 50 pb. As sequências ORFAS (sequências em que apenas a leitura *forward* ou *reverse* passou no controle de qualidade) e os adaptadores do sequenciamento também foram removidos. Em seguida uma nova filtragem com o *FastQC* foi aplicada novamente em uma última verificação da qualidade.

5.3.5.2 *Indexação do genoma de referência com anotação, alinhamento e mapeamento das leituras*

Foi utilizada a versão mais recente do genoma humano GRCh38, hospedado pelo NCBI. O genoma de referência e sua anotação foram indexados para obtenção do arquivo de índice do genoma de referência e em seguida foi realizado o alinhamento e mapeamento das leituras. Os procedimentos foram realizados utilizando o software STAR (DOBIN, 2013), uma ferramenta de alinhamento de sequências que utiliza algoritmos matemáticos para determinar semelhança significativa entre os *loci* de sequências comparadas, para garantir que os transcritos analisados realmente pertencem aos genes caracterizados, possibilitando a aferição de sua função estrutural.

5.3.5.3 *Quantificação dos genes e geração da matriz de contagem*

As sequências mapeadas e os dados do genoma de referência foram utilizados para gerar tabelas que expressam as contagens com o número de leituras

alinhadas para os genes, de acordo com a condição do gene. Foi utilizado o parâmetro GeneCounts do STAR para esse processo (DOBIN, 2013).

5.3.6 Análise de expressão diferencial

Os genes diferencialmente expressos (DEGS, do inglês *Differentially expressed genes*) foram detectados com o uso do pacote DESeq2 versão 1.30.1 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), uma das bibliotecas estatísticas desenvolvidas em *software* R e disponibilizadas pelo projeto Bioconductor (GENTLEMAN et al., 2004). O pacote DESeq2 fornece métodos para testar a expressão diferencial pelo uso de modelos lineares generalizados binomiais negativos (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). As etapas de análise de expressão diferencial foram agrupadas em uma função chamada DESeq, na qual foi feita uma normalização (estimar fatores de normalização), uma dispersão (estimar valores de dispersão), e obtenção das contagens normalizadas e em logaritmo para plotagem.

Foram aplicados modelos lineares generalizados binomiais negativos para cada gene e foi utilizado o teste de Wald para avaliar significância e as taxas de falsos positivos (FDR, do inglês *False Discovery Rate*) para ajustar o valor de P . O teste de Wald realiza a comparação entre a estimativa de máxima verossimilhança do parâmetro e a estimativa de seu erro padrão. O FDR expressa a proporção esperada de hipóteses nulas rejeitadas erroneamente possibilitando o controle dos falsos positivos. Foi também realizada análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) para detectar as relações entre as variáveis de expressão gênica. A PCA é um algoritmo matemático que reduz a dimensionalidade dos dados, enquanto retém a maior parte da variação no conjunto de dados. A PCA realiza essa redução identificando direções, chamadas de componentes principais, ao longo das quais a variação nos dados é máxima (PEARSON, 1901). A resultado da PCA foi representada pelas dimensões que os componentes principais 1 e 2 contribuem para diferenciação das amostras (DIM1 e DIM2). Para a descrição dos genes encontrados diferencialmente expressos foi utilizado o banco de dados Gene Cards (STELZER et al., 2016).

5.3.7 Análise de enriquecimento

Na sequência, a anotação dos genes que apresentaram expressão diferencial entre os fibroblastos com deficiência mitocondrial e os controles foi feita no *software* R com o auxílio do pacote *biomaRt* versão 2.46.3 do Ensembl (DURINCK S. et al., 2009), disponibilizado pelo projeto Bioconductor (GENTLEMAN et al., 2004). Foi realizada a análise de enriquecimento funcional de vias metabólicas utilizando a enciclopédia KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) (KANEHISA, 2000). Os processos biológicos modulados foram estudados utilizando o banco de dados GO (Gene Ontology) (ASHBURNER, 2000).

5.3.8 Expressão do gene *GCH1*

A expressão do gene *GCH1* nos fibroblastos deficientes em DARS2 foi quantificada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) CFX Connect utilizando o kit SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) seguindo instruções do fabricante.

5.3.9 Atividade enzimática da GTPCH

A atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente a 340 nm. A atividade da GTPCH foi avaliada acompanhando a formação de 7,8-trifosfato de diidroneopterina na presença de 1 mM de GTP, 5 mM de zinco, 0,1 % de Triton X-100 e 250 µg/mL de extrato de proteína. O coeficiente de extinção de $\epsilon_{340} = 1820 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos após correção para placas multipoços. As atividades estão representadas como mU/mg de proteína, e 1 U corresponde a 1 µmol de produto formado por min a 37 °C.

5.3.10 Análise de polimorfismos do gene *GCH1*

Foram estudados dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que têm sido reportados estarem relacionados com uma produção de GTPCH menos estável, o que produziria menos BH4. O gene *GCH1* codifica para a enzima GTPCH que é a enzima limitante da via de síntese da BH4, sendo um dos principais determinantes

dos níveis de BH4 (THÖNY; AUERBACH; BLAU, 2000; EICHWALD et al., 2023). Tem sido identificado que o haplótipo funcional no gene *GCH1* ATG (rs8007267-rs3783641-rs10483639) está associado à menor expressão do gene *GCH1*, menor disponibilidade plasmática e vascular de BH4, e resultados adversos à saúde (Antoniades et al 2008; Tegeder et al, 2006). O haplótipo completo é composto por 15 SNPs, mas pode ser determinado por três SNPs: rs8007267 na região promotora; rs3783641 no íntron 1 e rs10483639 na região 3' não traduzida (LUPO et al., 2012).

Para identificação dos polimorfismos do gene *GCH1* foram utilizadas as sondas descritas no **Quadro 2**. A qPCR foi realizada em 10 µL de 1 X TaqMAN® SNP Genotyping Assay (ThermoFisher Catalog # 43513779), 1 X TaqMAN® Universal PCR Mastermix, 10 ng DNA genômico e água estéril necessária para completar o volume final. Foi realizado um ciclo inicial de 30 s em 60 °C e 10 min em 95 °C em um termociclador (Eppendorf mastercycler realplex2). Após esta primeira etapa, foram realizados 50 ciclos de amplificação com as seguintes condições: 92 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e 30 s; ao final dos ciclos a última etapa foi de 60 °C por 30 s. Para a determinação do genótipo de cada amostra foi utilizado o software QuantStudio Design & Analysis (v1.5.2, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), que mostra um gráfico de amplificação, indicando a magnitude do sinal gerado (ΔR_n) pela quantidade de ciclos; o programa detecta o sinal fluorescente correspondente ao alelo. Foi analisado se os indivíduos afetados pela deficiência em DARS2 possuíam os SNPs rs8007267 e rs3783641.

Quadro 2 - Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *GCH1*

zSNPs	Local	Polimorfismo	Sequência das sondas VIC e FAM (VIC®/FAM®)	% global
rs8007267	Chr.14: 54912273 - 54912273	C/T, Substituição de transição	AATAGGAGCGTGTGT TTGAACAGTA[C/T]AC GCCAAACTTCAGTCAT TCAAGTA	C – 69%
				T – 31%
rs3783641	Chr.14: 54893421 - 54893421	A/T, Substituição de transversão	ATTACAGTCCTCATAT AGAAATCAC[A/T]GGC AAATGAGTCAGGTGG GGAATGC	T – 77%
				A – 23%

Abreviações: % global= Porcentual em que o alelo é encontrado na população mundial;

Local= Local no cromossomo onde o polimorfismo está localizado; VIC®/FAM®= Intensidade de fluorescência emitida. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). A comparação entre dois grupos independentes e com distribuição normal foi realizada empregando o teste t de Student. O teste U de Mann-Whitney foi empregado quando os dados foram não paramétricos. A comparação entre mais de dois grupos foi realizada utilizando o teste ANOVA de uma via quando uma única variável foi analisada, ou de duas vias quando duas variáveis foram analisadas. Comparações com $P \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

Para as análises de expressão diferencial foi utilizado o teste de Wald para avaliar significância e para ajustar o valor de P , foram considerados significativos os transcritos que apresentavam valor c e $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$ e ≤ -1 . Para análise de enriquecimento foram consideradas apenas as vias e processos com valor de P ajustado $\leq 0,05$.

As análises estatísticas e gráficos foram realizadas empregando o programa Prism 8.0.1 (GraphPad Software 8.0.1, Estados Unidos). A análise de expressão diferencial dos fibroblastos deficientes em DARS2 e enriquecimentos dos genes diferencialmente expressos foram realizadas no programa R (*R Core 2023*) e para as representações gráficas foi utilizado o pacote ggplot2.

6 RESULTADOS

6.1 O COMPROMETIMENTO DO METABOLISMO DA BH4 NA DEFICIÊNCIA ENERGÉTICA INDUZIDA PELA RESERPINA EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS

A primeira prova de conceito que o metabolismo da BH4 poderia estar alterado em deficiências energéticas mitocondriais foi testada em animais de experimentação que receberam reserpina. Nosso grupo de pesquisa e outros já tem descrito que esta toxina provoca deficiência energética por inibir a atividade do complexo I mitocondrial entre outros efeitos deletérios (BINDOFF et al., 1989; SCHAPIRA, 1990, 2008). A **Figura 2** mostra o efeito do comprometimento mitocondrial e a modulação no metabolismo da BH4 induzido pela reserpina em camundongos suíços. A figura mostra que o tratamento com reserpina provocou alterações na morfologia e metabolismo mitocondrial que caracterizaram um estado de deficiência energética tecidual. A **Figura 2A** mostra imagens de mitocôndrias intermiofibrilares (IMF) e subsarcolemais (SS) de animais que receberam veículo, representativas de seções do músculo *soleus*, músculo predominantemente de fibras de contração lenta do tipo I em um plano longitudinal obtidas por MET. As mitocôndrias IMF apresentam uma arquitetura esferoide e se encontram posicionadas entre as miofibrilas em ambos os lados das linhas Z do sarcômero (**Figura 2A**). As mitocôndrias SS localizadas logo abaixo do sarcolema apresentam maior proximidade umas das outras e maior tamanho que a mitocôndrias IMF (**Figura 2A**).

O tratamento com reserpina provocou alterações no tamanho, na taxa de ramificação mitocondrial, e na distribuição das mitocôndrias IMF. Pode ser observado na **Figura 2B** que o tratamento com reserpina reorganizou a estrutura mitocondrial favorecendo a formação de mitocôndrias IMF com maior superfície, com formato tubular, e interconectadas através do sarcômero (mitocôndrias trabeculares). A **Figura 2B** mostra que as mitocôndrias SS também apresentaram uma maior superfície no músculo de animais que receberam reserpina, embora se mantiveram com uma morfologia mais esferoide do que as IMF.

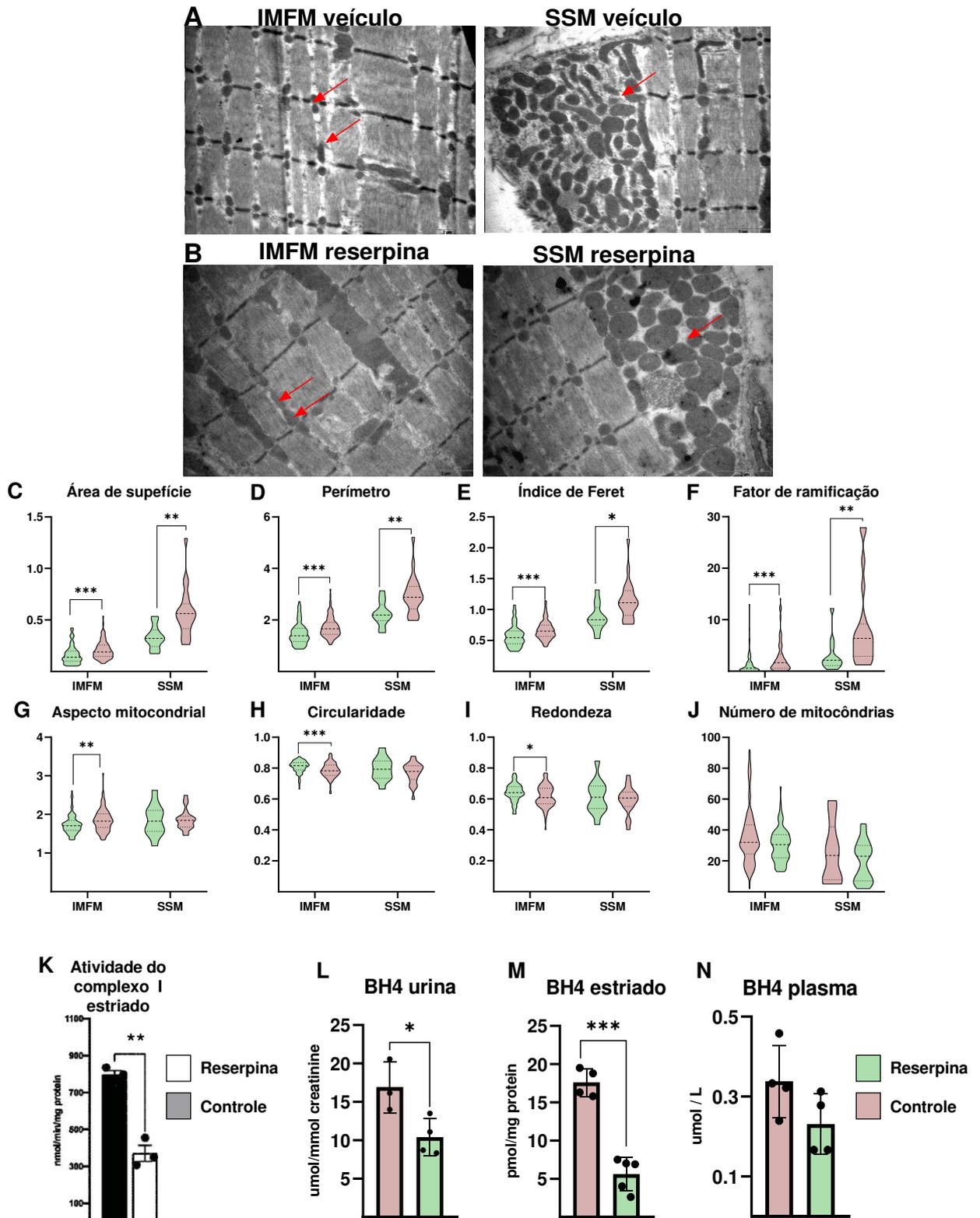
As alterações na morfologia mitocondrial identificadas por MET foram também quantificadas e são mostradas nas **Figuras 2C-2J**. O estudo da morfometria mitocondrial mostrou que o tratamento com reserpina favoreceu a remodelagem mitocondrial gerando mitocôndrias IMF e SS de maior tamanho evidenciado pelo

aumento da área de superfície (IMF: [$U= 2573$; $P < 0,001$]; SS: [$t_{(31)}= 3,27$; $P < 0,01$]; **Figura 2C**), do perímetro mitocondrial (mitocôndrias IMF: [$U= 2486$; $P < 0,001$], mitocôndrias SS: [$t_{(31)}= 3,00$; $P < 0,01$]; **Figura 2D**).

As **Figuras 2E-2G** mostram que o tratamento também provocou um aumento na ramificação de organelas IMF e SS que foi evidenciado pelo aumento do índice de Feret (mitocôndrias IMF: [$U= 2498$; $P < 0,0001$]; mitocôndrias SS: [$t_{(31)}= 2,61$; $P < 0,001$]; **Figura 2E**), do fator de ramificação (IMF: [$U= 1808$; $P < 0,0001$]; SS: [$U= 36$; $P < 0,01$]; **Figura 2F**) e um aumento do aspecto mitocondrial em mitocôndrias IMF (mitocôndrias IMF: [$U= 2926$; $P < 0,01$]; mitocôndrias SS: [$t_{(31)}= 0,15$; $P > 0,05$]; **Figura 2G**). Em mitocôndrias IMF essas adaptações morfológicas foram também acompanhadas por uma redução na circularidade (mitocôndrias IMF: [$U= 2603$; $P < 0,0001$]; mitocôndrias SS: [$t_{(31)}= 1,1$; $P > 0,05$]; **Figura 2H**) e na redondeza (IMF: [$t_{(178)}= 2,52$; $P < 0,05$]; SS: [$t_{(31)}= 0,561$; $P > 0,05$]; **Figura 2I**). Embora numerosas alterações na morfologia mitocondrial foram observadas, o conteúdo mitocondrial não foi alterado pelo tratamento com reserpina (IMF: [$U= 3414$; $P > 0,05$]; SS: [$t_{(31)}= 1,03$; $P > 0,05$]; **Figura 2J**). Essas alterações morfológicas foram caracterizadas pela redução da atividade do complexo I no estriado ([$t_{(4)}= 8,60$; $P < 0,001$]; **Figura 1K**).

As **Figuras 2L-2M** mostram que todas essas adaptações metabólicas ocorreram com comprometimento do metabolismo da BH4. A **Figura 2L-2N** mostra que os níveis de BH4 se encontraram significativamente reduzidos no estriado de camundongos tratados com reserpina [$t_{(7)}= 8,82$; $P < 0,0001$] (**Figura 2L**). Quando as concentrações de BH4 foram quantificadas nos fluídos biológicos, valores significativamente menores foram encontrados na urina ([$t_{(5)}= 3,02$; $P < 0,05$]; **Figura 2M**) (plasma ([$t_{(6)}= 1,82$; $P > 0,05$]; **Figura 2N**).

Figura 2 - Comprometimento do metabolismo da BH4 na deficiência energética induzida pela reserpina em camundongos suíços

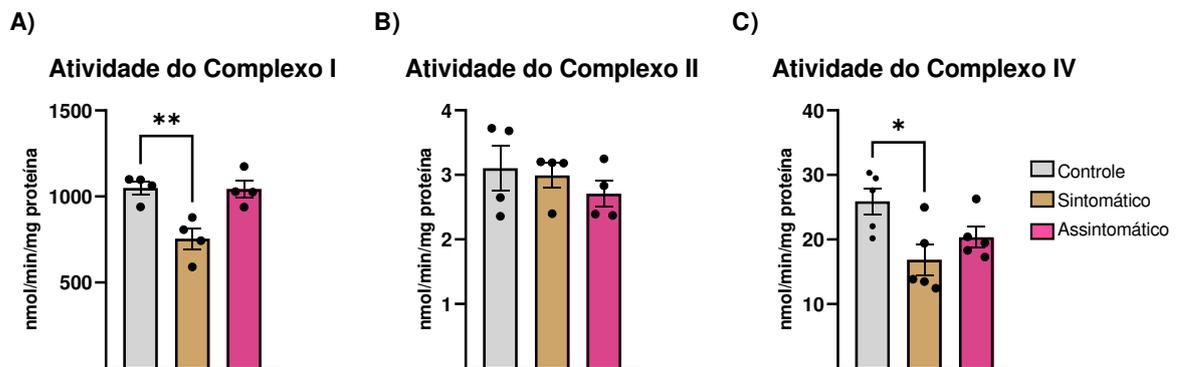


Legenda: Camundongos suíços machos (n=6 per grupo) receberam duas injeções intraperitoneais (i.p.) de reserpina (1 mg/kg) com intervalo de 48 h. Os animais controles receberam veículo (10 mL/kg). A morfologia de mitocôndrias intermiofibrilares (IMF) e subsarcolemas (SS) foi avaliada por microscopia eletrônica e quantificada usando o software ImageJ (ver M&M para detalhes). Em **A** estão representadas mitocôndrias IMF e SS de camundongos que receberam veículo, e em **B** estão representadas mitocôndrias IMF e SS após tratamento com reserpina. As setas indicam a posição das mitocôndrias IMF e SS (**A e B**). O tamanho das mitocôndrias foi avaliado pela mensuração da área da superfície (**C**) e perímetro (**D**). A ramificação das mitocôndrias foi avaliada pelo índice de Feret (**E**), fator de ramificação (**F**) e aspecto mitocondrial (**G**). O formato arredondado das mitocôndrias foi avaliado pela circularidade (**H**) e redondeza (**I**). O conteúdo mitocondrial foi avaliado pela contagem do número de mitocôndrias (**J**). Os níveis de BH4 foram quantificados por cromatografia líquida acoplada a detecção eletroquímica na urina (**L**), no estriado (**M**) e no plasma (**N**) de camundongos que receberam reserpina. Essas alterações morfológicas foram caracterizadas pela redução da atividade do complexo I no estriado (**K**). As barras representam a média \pm erro padrão da média. Teste *t* de Student, Controle vs. Reserpina, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Teste de Man-Whitney, Controle vs. Reserpina, * $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

6.2 COMPROMETIMENTO DO METABOLISMO DA BH4 NO DÉFICIT ENERGÉTICO PROVOCADO PELA DEFICIÊNCIA GENÉTICA DE DARS2 EM FIBROBLASTOS HUMANOS

Tendo identificado que o metabolismo da BH4 se encontrou comprometido em tecidos e fluídos de animais com deficiência energética induzida pela reserpina, o próximo passo foi demonstrar que esta deficiência metabólica também acontece em células humanas. Para isso, o estado energético e a biossíntese de BH4 foram avaliados em células humanas deficientes em DARS2, um gene que codifica para a aspartil-tRNA sintetase mitocondrial. A **Figura 3** mostra que as células deficientes em DARS2 apresentaram deficiência nas atividades dos complexos I [$F_{(2,9)} = 11,20$; $P < 0,005$] (**Figura 3A**), e IV [$F_{(2,12)} = 5,158$; $P < 0,05$] (**Figura 3C**) da cadeia respiratória, enquanto que a atividade do complexo II não apresentou mudanças significativas [$F_{(2,9)} = 0,60$; $P > 0,05$] (**Figura 3B**).

Figura 3 - Atividade das enzimas dos complexos I, II, e IV da cadeia respiratória em fibroblastos deficientes em DARS2



Legenda: (A) A atividade do complexo I foi mensurada através da redução do ferricianeto dependente de NADH a 420 nm, (B) a do complexo II pela da redução do 2,6- dinitrofenolindofenol a 600 nm, e (C) a do complexo IV pela oxidação do citocromo *c* a 550 nm. As barras representam a média \pm erro padrão da média. ANOVA de uma via seguido do teste *post hoc* de Tukey, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Considerando que foi identificada deficiência energética nos fibroblastos deficientes em DARS2 o próximo passo foi analisar o transcriptoma gerado por essas células. A **Figura 4** mostra o resultado da análise do transcriptoma de fibroblastos provenientes de indivíduos afetados pela deficiência em DARS2. As características clínicas dos indivíduos afetados pela deficiência no gene DARS2 incluídos no trabalho estão descritas na seção de Material e Métodos (seção: 5.2.1; página: 38) e resumidas na **Tabela 1**. Foram incluídos dois indivíduos deficientes em DARS2, ambos com as mesmas mutações no gene DARS2 (**Tabela 1**) e que apresentaram sinais compatíveis com a doença LBSL. No entanto, apenas um dos indivíduos se apresentou sintomático.

Tabela 1 - Mutações identificadas nos indivíduos afetados pela deficiência em DARS2

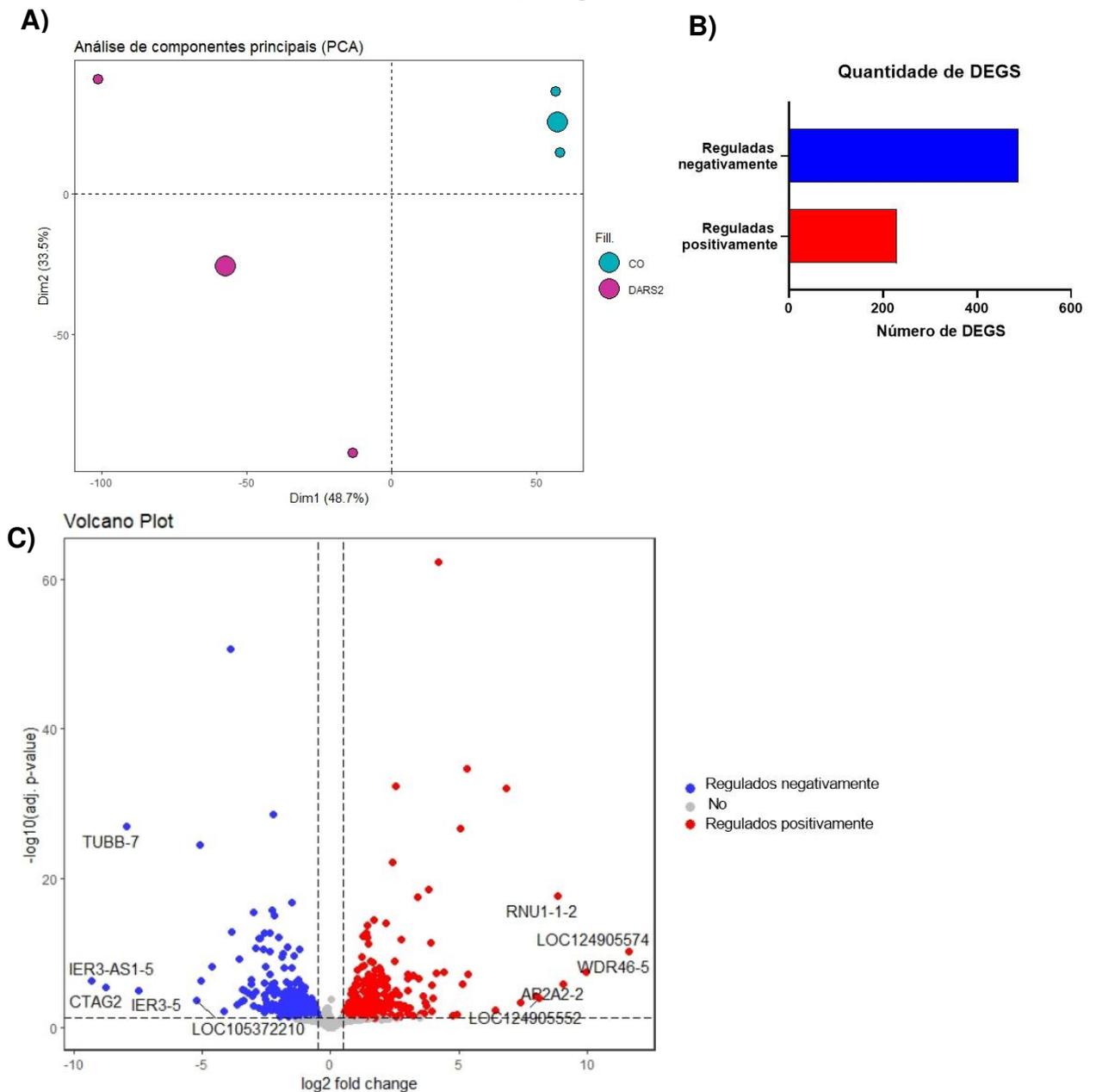
Idade (anos)	Mutação 1 no gene DARS2	Mutação 2 no gene DARS2	Sintomático	MRI	Sexo
8	c.492 + 2 T > C	c.228-17C > G	Sim	Alterada	M
4	c.492 + 2 T > C	c.228-17C > G	Não	Alterada	M
4	Selvagem	Selvagem	NA	NA	M

Abreviações= MRI: Ressonância magnética cerebral; M: Masculino; NA= Não se aplica.

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

A análise da PCA, que tem como objetivo condensar a informação contida num grande número de variáveis originais em um conjunto menor de variáveis estatísticas (componentes), com uma perda mínima de informação, está apresentada na **Figura 4**. A análise mostrou agrupamentos de dados opostos, identificando que as DEGS das amostras estudadas (**Tabela 2**) permitiram diferenciar os fibroblastos deficientes de DARS2 dos fibroblastos do controle (**Figura 4A**). O Dim1 contribuiu em 48,7 % para a separação dos grupos, e o Dim2 contribuiu em 33,5 % (**Figura 4A**). Foram identificados 717 genes como diferencialmente expressos nos fibroblastos deficientes em DARS2 em relação ao controle, sendo que desse total 229 se encontraram regulados positivamente ($P_{adj} \leq 0,05$; $\log_2\text{FoldChange} \geq 1$), e 488 regulados negativamente ($P_{adj} \leq 0,05$; $\log_2\text{FoldChange} \leq 1$) (**Figura 4B**). Na **Figura 4C** estão representados os genes diferencialmente expressos, estando identificados os principais genes regulados positivamente e os principais genes regulados negativamente. Os genes mais importantes em termos quantitativos com regulação positiva estiveram relacionados com processos de endocitose e *splicing*, enquanto os regulados negativamente com processos de formação estrutural celular e tumorais (**Tabela 2**).

Figura 4 - Análise de expressão gênica diferencial em fibroblastos deficientes em DARS2



Legenda: (A) Análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) da expressão diferencial de genes em fibroblastos deficientes em DARS2 e fibroblastos do controle; DIM1 representa dimensão que o componente 1 contribui para a diferenciação das amostras; DIM2 representa dimensão que o componente 2 contribui para a diferenciação das amostras. (B) Gráfico apresentando a quantidade de genes regulados positivamente em vermelho ($P_{\text{adj}} \leq 0,05$; $\log_2 \text{FoldChange} \geq 1$), e regulados negativamente em azul ($P_{\text{adj}} \leq 0,05$; $\log_2 \text{FoldChange} \leq -1$). (C) *Volcano plot* da análise de expressão diferencial dos transcritos. Em vermelho estão representados os transcritos regulados positivamente, em azul os transcritos regulados negativamente e em cinza os genes que não foram identificados como diferencialmente expressos ($P_{\text{adj}} \geq 0,05$). No gráfico estão identificados os nomes dos genes com valores de $\log_2 \text{FoldChange}$ mais significativos (ver **Tabela 2**). Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Tabela 2 - Principais genes diferencialmente expressos (DEGS) encontrados em fibroblastos deficientes em DARS2 ($P_{adj} \leq 0,05$; $\log_2\text{FoldChange} \leq -1$ ou ≥ 1) e as funções associadas aos genes

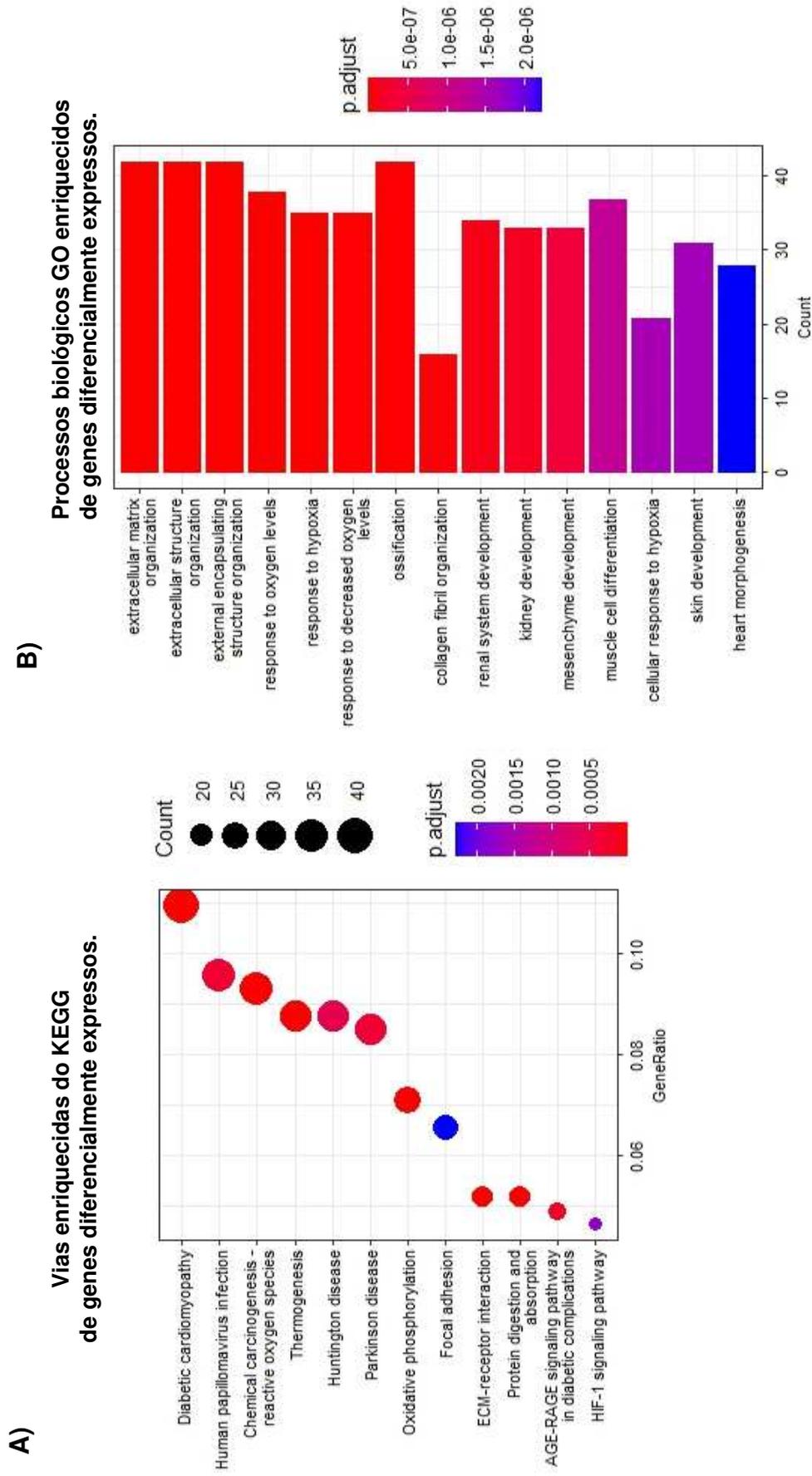
Gene	$\log_2\text{FoldChange}$	P_{adj}	Função/Descrição
Expressão gênica regulada positivamente			
LOC124905574	11,6252	$7,21E^{-11}$	RNA que compõe o spliceossomo, um complexo macromolecular composto por RNAs e proteínas que realiza o processo de <i>Splicing</i> (de remoção de introns e ligação de exons). É um gene da classe snRNA, que são RNAs que possuem o papel de mediar processos que acontecem durante a transcrição do RNA.
WDR46-5	9,9909	$3,73E^{-08}$	Componente da estrutura nucleolar.
AP2A2-2	9,0736	$1,46E^{-06}$	Envolvido na endocitose dependente de clatrina e endocitose regulada pelo ARF6.
RNU1-1-2	8,8532	$2,77E^{-18}$	RNA da classe snRNA. Entre suas vias relacionadas estão o ciclo dos spliceossomos no <i>splicing</i> .
LOC124905552	8,1316	0,0001	Rootletin-Like é um pseudogene (sequência genômica semelhante a outro gene, mas com função comprometida)
Expressão gênica regulada negativamente			
LOC105372210	-5,2436	0,0002	Não caracterizado, é um gene da classe ncRNA.
IER3-5	-7,5125	$1,16E^{-05}$	Atua na proteção de células contra apoptose induzida por fator de necrose tumoral tipo alfa.
TUBB-7	-7,9601	$1,37E^{-27}$	Atua na formação estrutural dos microtúbulos. Mutações neste gene causam malformações cerebrais.
CTAG2	-8,7692	$4,23E^{-06}$	Codifica para uma proteína expressa em uma ampla variedade de cânceres, incluindo melanoma, câncer de mama, câncer de bexiga e câncer de próstata.
IER3-AS1-5	-9,3397	$5,39E^{-07}$	RNA anti-senso IER3 1. RNA da classe lncRNA

Abreviações: snRNA= RNA pequeno nucleolar; ncRNA= RNA não codificante; lncRNA= RNA não codificante longo; ARF6= Fator 6 de ribosilação de difosfato de adenosina.

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Para interpretar o papel biológico das DEGS foi realizada a análise de enriquecimento funcional das vias metabólicas utilizando a enciclopédia KEGG, e dos termos do banco de dados do GO. O resultado da análise do KEGG mostrou 33 vias metabólicas significativamente enriquecidas (apenas as 12 vias mais significativas estão representadas na **Figura 5A**). As DEGS se encontraram enriquecidas em vias como a fosforilação oxidativa e vias que estimulam a glicólise, como aquela que envolve o fator induzível por hipóxia (HIF-1) em fibroblastos deficientes em DARS2 (**Figura 5A**). O resultado de enriquecimento dos processos biológicos do GO listou 218 termos enriquecidos (apenas os 15 processos biológicos mais significativos estão representados na **Figura 5B**), estando entre eles resposta aos níveis de oxigênio, resposta a diminuição dos níveis de oxigênio, e resposta celular a hipóxia (**Figura 5B**). Esses são processos que resultam numa mudança no estado ou atividade de uma célula ou organismo (em termos de movimento, secreção, produção de enzimas, expressão genética, etc.) como resultado de um estímulo que reflete a presença, ausência ou concentração de oxigênio.

Figura 5 - Análise de enriquecimento dos genes diferencialmente expressos em fibroblastos deficientes em DARS2



Legenda: (A) Principais vias metabólicas (em termos quantitativos) enriquecidas analisadas através da enciclopédia de genes e genomas de Kyoto (KEEG) ($P_{adj} \leq 0,05$). (B) Principais processos biológicos (em termos quantitativos) enriquecidos de acordo com o banco de dados de ontologia genética (GO) ($P_{adj} \leq 0,05$). Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Após a identificação dos principais processos biológicos enriquecidos em fibroblastos deficientes em DARS2, foi realizada uma análise da interação entre eles. A **Figura 6A** mostra que existiu uma associação entre os processos de resposta a hipóxia e de resposta a níveis de oxigênio, a estímulos abióticos (fatores ambientais), e de estresse. Ao analisar os genes envolvidos nesses processos enriquecidos foi identificado um conjunto de genes envolvidos nos processos de resposta a hipóxia e aos níveis de oxigênio (**Figura 6B**). Um segundo conjunto de genes foi identificado com os genes envolvidos nos processos de organização da estrutura celular e matriz extracelular, sendo identificados 4 genes compartilhados entre os dois conjuntos (**Figura 6B**). Ao todo foram identificados 37 genes relacionados com os processos biológicos de resposta aos níveis de oxigênio, sendo desse total 17 regulados positivamente e apenas 6 regulados negativamente (**Tabela 3**). Pode ser observado na **Tabela 3** que entre os genes regulados positivamente estão genes envolvidos com epigenética, formação de colágeno, transporte e metabolismo da glicose, inflamação e geração de espécies reativas de oxigênio. Entre os genes regulados negativamente estão genes envolvidos com a montagem e atividade do complexo I da cadeia respiratória, na homeostase da glicose, na resposta a danos no DNA e na produção de energia (**Tabela 3**).

Figura 6 - Associação de genes e processos biológicos enriquecidos em fibroblastos deficientes em DARS

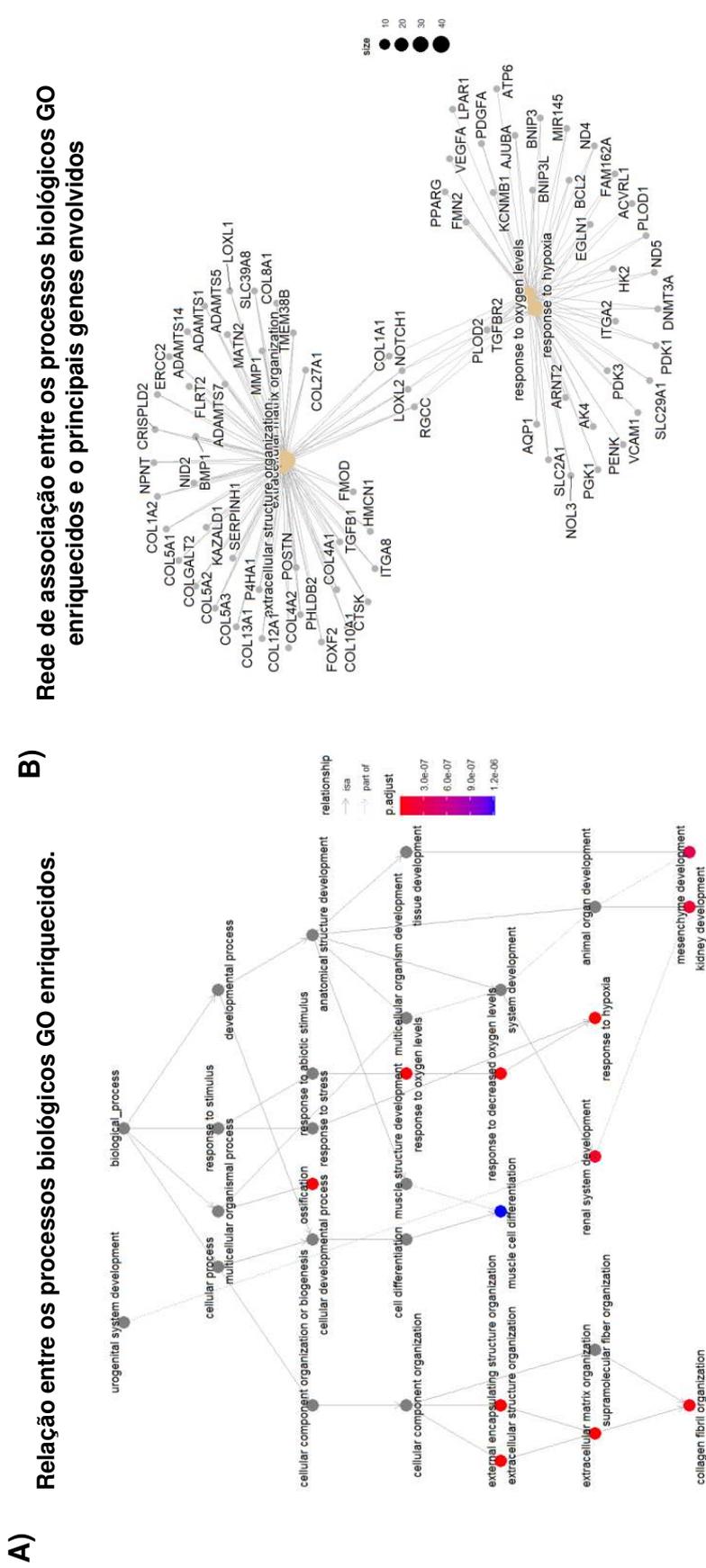


Tabela 3 - Principais genes envolvidos nos processos biológicos de resposta aos níveis de oxigênio encontrados enriquecidos em fibroblastos deficientes em DARS2

Gene	log2FoldChange	Padj	Função/Descrição
Expressão gênica regulada positivamente			
LOXL2	1,5094	0,0002	Medeia a desaminação da 'Lys-4' trimetilada da histona H3, um marcador específico para ativação transcricional epigenética
COL1A1	1,0350	2,28E ⁻⁰⁸	É um membro do colágeno do grupo I (colágeno formador de fibrilas).
PLOD2	1,6000	4,67E ⁻⁰⁶	Forma resíduos de hidroxilisina, que servem como locais de ligação para unidades de carboidratos e são essenciais para a estabilidade das ligações cruzadas do colágeno intermolecular.
AQP1	1,9506	2,82E ⁻⁰⁸	Componente do complexo anquirina-1, um complexo multiproteico envolvido na estabilidade e na forma da membrana eritrocitária
SLC2A1	1,9430	2,18E ⁻⁰⁸	Transportador facilitador de glicose, responsável pela captação constitutiva ou basal de glicose Transportador de energia mais importante do cérebro, presente na barreira hematoencefálica.
VCAM1	3,0300	6,85E ⁻⁰⁸	Glicoproteína de adesão celular expressa predominantemente na superfície das células endoteliais que desempenha um papel importante na vigilância imunológica e na inflamação.
PDK1	1,4788	4,89E ⁻⁰⁷	Quinase que desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos e na homeostase. Por meio da fosforilação de subunidades da piruvato desidrogenase regula o fluxo do metabólito através do ciclo do ácido

			<p>tricarboxílico, regulando negativamente a respiração aeróbica.</p> <p>Desempenha um papel importante para a proliferação celular sob hipóxia e também protege as células contra a apoptose em resposta à hipóxia e ao estresse oxidativo.</p>
PDK3	1,0589	0,004332	<p>Desempenha um papel na homeostase da glicose e na manutenção dos níveis normais de glicose no sangue em função dos níveis de nutrientes e sob fome.</p> <p>Desempenha um papel na geração de espécies reativas de oxigênio.</p>
ARNT2	1,8348	1,83E ⁻⁰⁶	<p>Fator de transcrição que desempenha um papel no desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise, no crescimento cerebral pós-natal e na função visual e renal.</p>
HK2	1,7677	0,0010	<p>Catalisa a fosforilação de hexose.</p> <p>Desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade da membrana mitocondrial externa, impedindo a liberação de moléculas apoptogênicas do espaço intermembrana e subsequente apoptose.</p>
PLOD1	0,7036	0,0045	<p>Parte de um complexo composto por PLOD1, P3H3 e P3H4 que catalisa a hidroxilação de resíduos de lisina nas cadeias alfa de colágeno e é necessário para a montagem normal e reticulação de fibrilas de colágeno (por similaridade).</p>
MIR145	2,3624	0,0176	<p>MicroRNA 145. Entre suas vias relacionadas estão a diferenciação celular - índice expandido e regulação de miRNA da resposta a danos no DNA.</p>
KCNMB1	3,2424	0,0282	<p>Atua como um regulador negativo da contração do músculo liso, aumentando a</p>

			sensibilidade do cálcio ao KCNMA1.
AJUBA	1,1039	0,0005	Envolvido em processos celulares, como determinação do destino celular, organização do citoesqueleto, repressão da transcrição gênica, mitose, adesão célula-célula, diferenciação celular, proliferação e migração. É um componente da via de sinalização de IL-1 que modula a ativação de NFKB1 induzida por IL-1. Atua como um regulador hipóxico, permitindo a degradação eficiente do HIF1A. Regula positivamente o silenciamento gênico mediado por miRNA.
PDGFA	1,6971	9,77E ⁻⁰⁸	Fator de crescimento que desempenha um papel essencial na regulação do desenvolvimento embrionário, proliferação celular, migração celular, sobrevivência e quimiotaxia. Necessário para o desenvolvimento normal de oligodendrócitos e mielinização normal na medula espinhal e cerebelo.
VEGFA	1,2435	1,63E ⁻⁰⁶	Induz a proliferação de células endoteliais, promove a migração celular, inibe a apoptose e induz a permeabilização dos vasos sanguíneos.
Expressão gênica regulada negativamente			
RGCC	-1,17255	0,008122	Modula a atividade de quinases específicas do ciclo celular.
PENK	-2,37991	1,17E-05	Aumenta a liberação de glutamato no corpo estriado e diminui a concentração de GABA no corpo estriado.
ND4	-1,07443	0,012362	Subunidade central do Complexo I da cadeia respiratória. Essencial para a

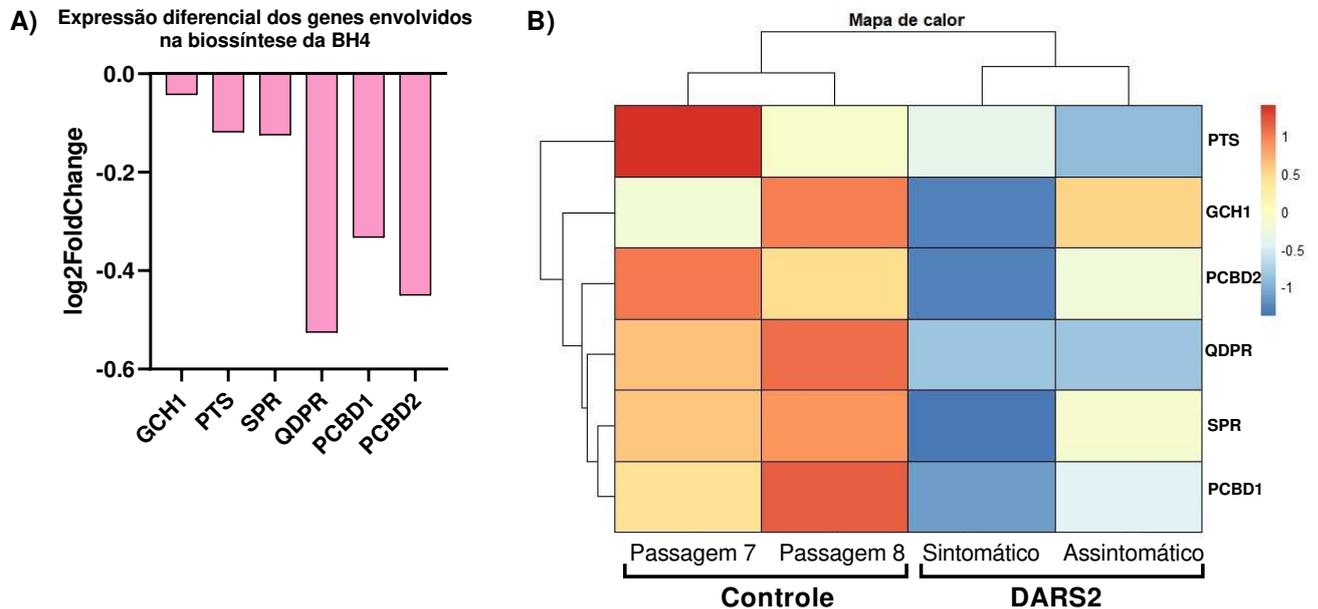
			atividade catalítica e montagem do complexo I.
FMN2	-1,06274	1,04E-05	Desempenha um papel nas respostas a danos no DNA, estresse celular e hipóxia, protegendo o CDKN1A contra a degradação e, portanto, desempenha um papel na parada do ciclo celular induzida por estresse.
PPARG	-1,44229	0,001734	Regulador chave da diferenciação de adipócitos e da homeostase da glicose.
ATP6	-1,6935	0,00011	Subunidade 6 da ATP sintase da membrana mitocondrial. Componente chave do canal de prótons.

Abreviações: miRNA= microRNA; KCNMA1= Subunidade alfa-1 do canal de potássio ativado por cálcio; NFKB1= Subunidade 1 do Fator Nuclear Kappa B; IL-1= Interleucina 1; HIF1A= Fator 1-alfa induzível por hipóxia; CDKN1A= Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A, DNA= Ácido desoxirribonucleio; PLOD1= Procolágeno-lisina,2-oxoglutarato 5-dioxigenase 1; P3H3= Prolil 3-hidroxilase 3; P3H4= prolil 3-hidroxilase 4; GABA = Ácido gama-aminobutírico; ATP = Adenosina trifosfato.

Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Ao buscar expressão diferencial especificamente dos genes envolvidos nas vias de síntese da BH4 foi encontrado que todos os genes apresentaram valores negativos de log₂FoldChange (**Figura 7A** e **Tabela 4**). Apesar da expressão diferencial dos genes não apresentar valores significativos de log₂FoldChange e de P ($P_{adj} \leq 0,05$; $\log_2\text{FoldChange} \leq -1$ ou ≥ 1) (**Tabela 4**) ao serem comparados os fibroblastos deficientes em DARS2 com o controle, os genes se apresentam regulados negativamente como representado na **Figura 7B**. Pode ser observado na figura que os fibroblastos provenientes do indivíduo que se apresentou com fenótipo sintomático (**Tabela 1**) mostrou uma regulação mais negativa em relação ao outro indivíduo deficiente em DARS2 que ainda não manifestou a doença, ao compará-los com o controle (**Figura 7B**).

Figura 7 - Expressão diferencial dos genes envolvidos nas vias de síntese de tetraidrobiopterina (BH4) em fibroblastos deficientes em DARS2



Legenda: (A) Gráfico de barras representando o valor de log2FoldChange dos genes envolvidos na via de síntese da BH4. (B) Mapa de calor representando uma comparação da expressão dos genes envolvidos nas vias de síntese da BH4 nas amostras de fibroblastos deficientes em DARS2 (o indivíduo sintomático e o indivíduo assintomático) em comparação com o controle. Para o controle estão representadas duas amostras obtidas do mesmo indivíduo, mas em diferentes passagens celulares: passagens 7 e 8. Em escala de azul estão representados os genes regulados negativamente, e em escala de vermelho os regulados positivamente. Abreviações: GCH1= GTP ciclohidrolase; PTS= 6-Piruviltetrahydropterina sintase; SPR= Sepiapterina redutase; QDPR= Quinóide dihydropteridina redutase; PCBD1= Pterina-4 alfa-carbinolamina desidratase 1; PCBD2= Pterina-4 alfa-carbinolamina desidratase 2. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

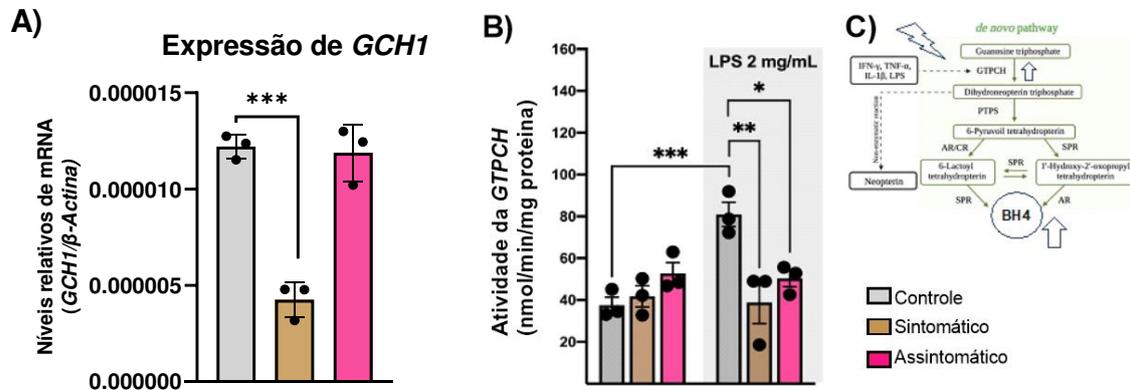
Tabela 4 - Expressão diferencial dos genes envolvidos nas vias de síntese da BH4 em fibroblastos deficientes em DARS2

Gene	log2FC	Pvalue	Padj
GCH1	-0,0424	0,4065	0,8539
SPR	-0,1243	0,2511	0,7343
QDPR	-0,5251	0,0025	0,0566
PTS	-0,11838	0,2714	0,7537
PCBD2	-0,3321	0,0254	0,2498
PCBD1	-0,4496	0,0160	0,1924

Abreviações: GCH1= GTP cicloidrolase; PTS= 6-Piruviltetrahydropterina sintase; SPR= Sepiapterina redutase; QDPR= Quinóide dihydropteridina redutase; PCBD1= Pterina-4 alfa-carbinolamina desidratase 1; PCBD2= Pterina-4 alfa-carbinolamina desidratase 2. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Para confirmar a regulação negativa dos genes envolvidos na biossíntese de BH4 apresentados na **Figura 7** e na **Tabela 4**, foi realizada a quantificação da expressão gênica por qPCR do gene *GCH1* que codifica para a enzima limitante da via metabólica, a GTPCH. A **Figura 8A** mostra que o indivíduo sintomático apresentou expressão reduzida do gene *GCH1* em relação ao controle [$F_{(2,6)} = 53,43$; $P < 0,05$], enquanto o indivíduo assintomático não apresentou diferença na expressão do gene ($P > 0,05$) (**Figura 8A**). A redução na expressão gênica de *GCH1* resultou numa incapacidade da enzima GTPCH de aumentar a atividade enzimática quanto estimulada por LPS (Interação= [$F_{(2,12)} = 9,72$; $P < 0,01$]; LPS= [$F_{(1,12)} = 6,66$; $P < 0,05$]; Genótipo= [$F_{(2,12)} = 5,05$; $P < 0,05$) (**Figura 8B**).

Figura 8 - A via da síntese *de novo* da tetraidrobiopterina (BH4) se encontra comprometida nos fibroblastos dos indivíduos afetados pela deficiência em DARS2

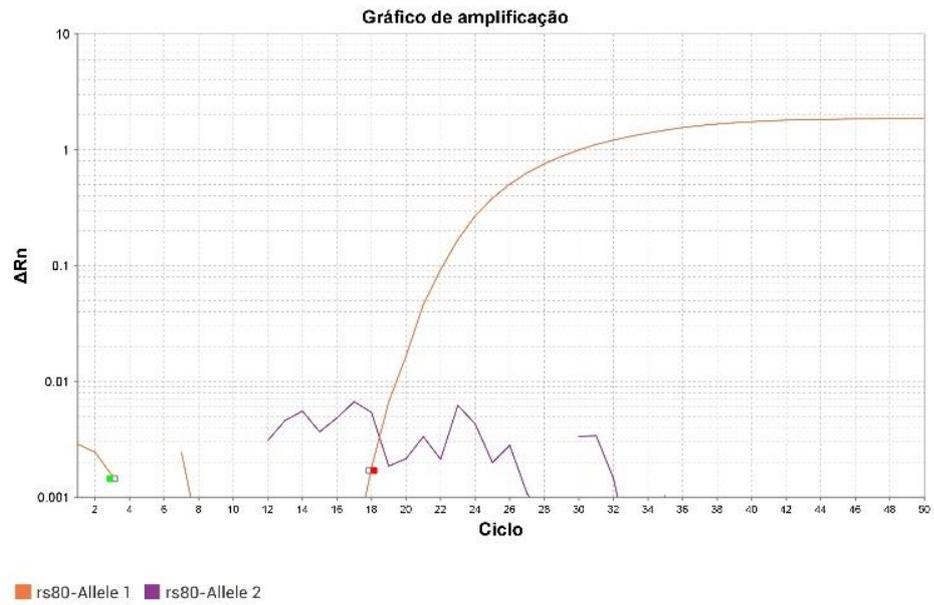


Legenda: (A) Quantificação da expressão do gene *GCH1* realizado por qPCR. O RNA total foi extraído dos fibroblastos empregando o kit comercial PureLink™ RNA Mini (Invitrogen, Cat.12–183-018A, Waltham, EUA) e as amostras foram tratadas com PureLink™ DNase Set (Invitrogen, Cat. 12.185.010) para produzir RNA puro. (B) Atividade da GTP ciclohidrolase (GTPCH), enzima limitante da via *de novo* da BH4 e do fluxo metabólico da pterina. A atividade da GTPCH foi mensurada em condições basais e após serem expostas a lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 2 mg/mL; 24 h; LPS, Sigma cepa E. coli O127:B8, St. Louis, MO, Estados Unidos). A atividade da GTPCH foi mensurada espectrofotometricamente a 240 nm. (C) LPS é um dos principais ativadores da transcrição de *GCH1*, o que rapidamente ativa a biossíntese de BH4. O esquema mostra a modulação da via da síntese *de novo* de biossíntese de BH4 quando estimulada por LPS. Os fibroblastos deficientes em DARS2 não mostraram diferenças em condições basais em relação ao controle, mas quando estimulados com LPS só o controle respondeu positivamente aumentando a atividade. As barras representam a média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida de comparações múltiplas. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

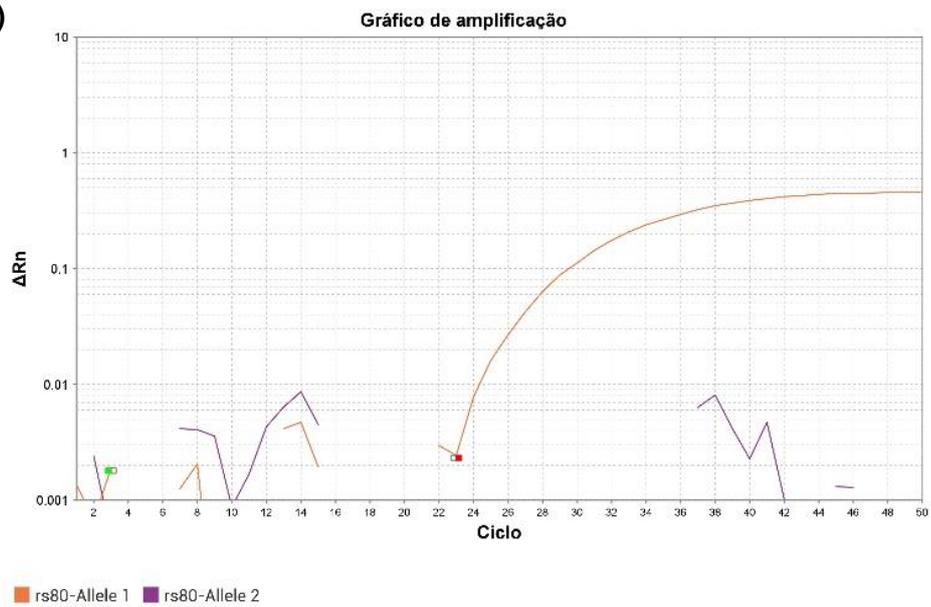
Considerando a existência de polimorfismos no gene *GCH1*, dois dos SNIPs reportados no haplótipo funcional do gene, ATG (rs8007267-rs3783641-rs10483639), relacionado com uma menor expressão do gene *GCH1* e consequente menor produção de BH4 foram adicionalmente estudados nos fibroblastos dos indivíduos com deficiência em DARS2 (Tabela 1). A Figura 9 mostra que o SNIP rs8007267 se apresentou em homozigose do alelo C ambas as amostras (Figura 9A e 9B). Da mesma forma que o SNIP rs3783641 se apresentou em homozigose do alelo T em ambas as amostras (Figura 9C e 9D). Esses dados indicam que os fibroblastos deficientes em DARS2 se apresentaram em homozigose para um dos SNIPs relacionados com uma menor biossíntese de BH4.

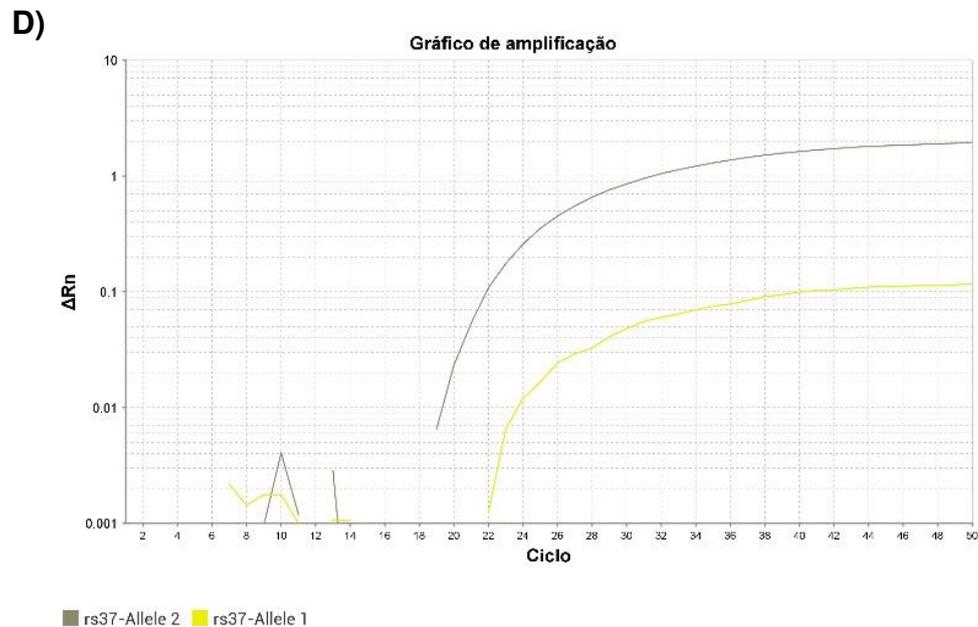
Figura 9 - Polimorfismos de nucleotídeo único (SNIP) do gene GCH1 identificados em fibroblastos deficientes em DARS2

A)



B)





Legenda: A genotipagem por discriminação alélica foi realizada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando o kit TaqMAN® SNP Genotyping Assay (ThermoFisher Catalog # 43513779) e TaqMAN® Universal PCR Mastermix. O DNA foi extraído empregando o kit comercial DNeasy Blood & Tissue (qiagen Cat. 69504). **(A)** Gráfico e amplificação do indivíduo sintomático utilizando a sonda rs8007267. **(B)** Gráfico e amplificação do indivíduo assintomático utilizando a sonda rs8007267. A linha laranja representa o fluoróforo VIC® e a roxa o FAM®. O SNIP se apresentou em homozigose do alelo C (representado por VIC®) em ambas as amostras. **(C)** Gráfico e amplificação do indivíduo sintomático utilizando a sonda rs3783641. **(D)** Gráfico e amplificação do indivíduo assintomático utilizando a sonda rs3783641. A linha amarela representa o fluoróforo VIC® e a cinza o FAM®. O SNIP se apresentou em homozigose do alelo do alelo T (representado por FAM®) em ambas as amostras. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

7 DISCUSSÃO

As DMP são os distúrbios metabólicos e neurológicos hereditários mais comuns, afetando 12,5 adultos e 4,7 crianças a cada 100.000 indivíduos (GORMAN et al., 2015). São doenças caracterizadas por defeitos na estrutura e na função mitocondrial e podem ser causadas por mutações do nDNA e/ou do mtDNA. Até o momento existem apenas tratamentos paliativos e empíricos para as DMP (VU; HIRANO; DIMAURO, 2002). A heterogeneidade genética, a fisiopatologia mal compreendida e a dificuldade da condução de ensaios clínicos representam obstáculos no caminho de um tratamento eficaz. Tendo em vista que as DMP são condições hereditárias altamente debilitantes com graves consequências para a saúde dos portadores novas opções de tratamento mais eficazes são necessárias. Diante disso e levando em conta o conhecimento sobre os papéis biológicos não canônicos mais recentemente descritos sobre o metabolismo da BH4 ativando a função mitocondrial e o sistema antioxidante, entre outros (GHISONI et al., 2015, 2016; CRONIN et al., 2018; DE PAULA MARTINS et al., 2018b), a suplementação com essa pterina poderia representar uma estratégia inovadora para o tratamento das DMP, visando uma melhora da qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Nosso grupo demonstrou que o metabolismo da BH4 apresenta funções fisiológicas adicionais às de cofator, apresentando propriedades de ativar o funcionamento mitocondrial (CRONIN et al., 2018; DE PAULA MARTINS et al., 2018b; DE PAULA MARTINS et al., 2018a), aumento da resistência contra o estresse oxidativo (GHISONI et al., 2015) (DE PAULA MARTINS et al., 2018a), favorece um estado anti-inflamatório (LATREMOLIERE et al., 2015; GHISONI 2016) e estimula processos cognitivos (GHISONI et al., 2016; LATINI et al., 2018). Por outro lado, de acordo com essas funções, foi descrito que quando os níveis de BH4 se tornaram limitantes foi favorecida a maior produção de EROS, dano mitocondrial, aumento da resposta inflamatória, prejuízos na neurotransmissão e na sinalização cerebral (CRONIN et al., 2018; KIM et al., 2007; WERNER; BLAU; THÖNY, 2011; BAILEY et al., 2017; RIVERA et al., 2017; KIM et al., 2019). Assim, a evidência disponível na literatura mostrou que a deficiência em BH4 resulta em disfunção mitocondrial; porém, ainda não há evidências de que o metabolismo da BH4 esteja prejudicado nas DMP. Caso essa relação seja identificada, a suplementação com a BH4 poderia se tornar um tratamento visando a melhora na qualidade de vida dos indivíduos afetados pela

disfunção mitocondrial. O racional desta proposta é que ao aumentar os níveis intracelulares de BH4, espera-se que as principais funções antioxidantes, anti-inflamatórias e relacionadas com uma melhora na saúde mitocondrial sejam estimuladas em tecidos com alto conteúdo em mitocôndrias, como por exemplo, no cérebro.

Diante do exposto, nesse trabalho foi investigado se o metabolismo da BH4 está de fato comprometido em disfunções mitocondriais adquiridas e genéticas. Para isso, o metabolismo da BH4 foi investigado em dois sistemas com a presença de disfunções mitocondriais. O primeiro foi o sistema de deficiência mitocondrial induzido quimicamente pela administração de reserpina. Essa toxina é empregada na indução experimental da DP, uma vez que atua como um inibidor do transportador vesicular da dopamina, comprometendo a sinalização dopaminérgica (DUTY; JENNER, 2011). A reserpina também provoca deficiência energética por inibir a atividade do complexo I mitocondrial, entre outros efeitos deletérios (SCHAPIRA, 1990; BRUM et al., 2020). O segundo sistema onde o metabolismo da BH4 foi investigado foi na deficiência primária do gene DARS2. Essa condição é causada por uma mutação no gene DARS2, que codifica a aspartil-tRNA sintetase mitocondrial (SCHEPER et al., 2007). A deficiência em DARS2 resulta em prejuízos na síntese de proteínas mitocondriais. A desregulação da síntese de proteínas mitocondriais resulta em forte deficiência da cadeia respiratória mitocondrial e já existe evidência de uma redução nos níveis das subunidades dos complexos I, III e IV (DOGAN et al., 2014). Portanto, esse sistema representa uma deficiência primária mitocondrial, mas uma deficiência secundária na atividade do complexo I da cadeia respiratória.

O complexo I é o maior componente proteico presente na membrana mitocondrial interna e é formado por sete unidades codificadas pelo mtDNA e por ao menos 34 subunidades codificadas pelo nDNA. Os complexos I e III são os principais geradores de EROS (BOVERIS; CADENAS; STOPPANI, 1976; CHEN et al., 2003) e esta produção se intensifica quando ocorre um bloqueio durante a transferência de elétrons (TURRENS; BOVERIS, 1980). Além disso, as EROS formadas no complexo I são liberadas na matriz mitocondrial (CHEN et al., 2003), provocando danos oxidativos nas enzimas mitocondriais, incluindo os complexos da cadeia respiratória, enzimas do ciclo de Krebs, cinases e várias outras proteínas, bem como no mtDNA (BANDY; DAVISON, 1990; HAUSLADEN; FRIDOVICH, 1994). Com base nisso, a atividade do complexo I também foi quantificada em ambos os sistemas analisados.

Outro parâmetro analisado foi a dinâmica mitocondrial, que representa a capacidade das mitocôndrias de se adaptar a demandas energéticas celulares modulando os processos de fusão e fissão, sendo assim um processo fundamental para manutenção da saúde celular (CHEN; CHAN, 2010; WESTERMANN, 2010). Esse processo tem o papel de manter a forma, distribuição e tamanho das mitocôndrias. As adaptações mitocondriais morfológicas transitórias e rápidas são cruciais para muitos processos celulares, como ciclo celular, imunidade, apoptose e controle de qualidade mitocondrial. Mutações nos componentes centrais da maquinaria e defeitos na dinâmica mitocondrial têm sido associados a inúmeras doenças humanas (TILOKANI et al., 2018).

Os resultados obtidos demonstraram que a deficiência na atividade do complexo I induzido por reserpina também provocou alterações na dinâmica mitocondrial. O uso da MET para avaliar a morfometria mitocondrial no quadríceps dos animais tratados com reserpina permitiu identificar numerosas adaptações, incluindo aumento no tamanho e fusão das mitocôndrias, e alteração na forma das mitocôndrias IMF, que se apresentaram ramificadas após o tratamento com reserpina. Essas alterações na forma das mitocôndrias foram anteriormente descritas no músculo estriado cardíaco de roedores tratados com uma dose similar de reserpina àquela usada neste trabalho. Os autores também demonstraram mitocôndrias disformes e ramificadas após 12 h do tratamento com a toxina (IWAYAMA, 1972).

Devido a conhecidas diferenças topológicas, funcionais e morfológicas entre mitocôndrias SS e IMF (PALMER; TANDLER; HOPPEL, 1977) as quantificações da morfometria mitocondrial foram realizadas neste estudo em ambas as subpopulações mitocondriais. As mitocôndrias SS estão localizadas abaixo da membrana plasmática, muitas vezes próximas de mionúcleos e capilares; enquanto as mitocôndrias IMF estão localizadas no núcleo das miofibras e entre as miofibrilas (MÜLLER, 1976; KAYAR, 1988). Em comparação com as mitocôndrias IMF, as mitocôndrias SS normalmente têm menor capacidade oxidativa, produzem níveis mais baixos de EROS e são mais sensíveis a eventos pró-apoptóticos (PALMER; TANDLER; HOPPEL, 1977; SERVAIS et al., 2003; ADHIHETTY et al., 2005).

Foi observado que as mitocôndrias SS se apresentaram na sua maioria como unidades esféricas isoladas, embora mitocôndrias relativamente alongadas também foram observadas. As mitocôndrias IMF se organizaram em um retículo interconectado por túbulos mitocondriais transversais próximos a linha Z. Esses

resultados estão de acordo com um estudo prévio de fisiologia comparativa onde mostrou que a arquitetura mitocondrial é caracterizada por mitocôndrias arredondadas na região sarcolemal e mitocôndrias que apresentaram projeções que se estendem entre as miofibrilas no músculo sóleo e no músculo vasto lateral de camundongos (KIRKWOOD; MUNN; BROOKS, 1986).

Ao observar a morfologia das mitocôndrias após o tratamento com a reserpina os resultados mostraram alterações no tamanho, na taxa de ramificação mitocondrial e na distribuição das mitocôndrias IMF, resultando em mitocôndrias IMF com maior superfície, formato tubular, e interconectadas através do sarcômero. Tem sido descrito que essas adaptações mitocondriais com interconexões entre as membranas mitocondriais resultantes de deficiências energéticas permitem a troca de moléculas (íons, lipídios, proteínas) entre as organelas (SKULACHEV, 2001; CHEN; MCCAFFERY; CHAN, 2007), protegendo as mitocôndrias saudáveis do processo de mitofagia (GOMES; BENEDETTO; SCORRANO, 2011; RAMBOLD et al., 2011). As mitocôndrias SS também apresentaram uma maior superfície no músculo de animais que receberam reserpina, embora se mantiveram com uma morfologia mais esferoide do que as IMF, demonstrando que a reserpina causou um aumento do tamanho de ambas as subpopulações de mitocôndrias. Também foi observado um aumento da ramificação de ambas subpopulações de mitocôndrias que receberam reserpina. Em mitocôndrias IMF foi observado um aumento na circularidade, enquanto esse efeito não foi demonstrado nas mitocôndrias SS, já que fisiologicamente já apresentavam um formato mais circular. Entretanto, o conteúdo mitocondrial não sofreu alterações em nenhuma das subpopulações mitocondriais, demonstrando que o tratamento com reserpina não promoveu um aumento na quantidade de mitocôndrias totais, senão uma adaptação metabólica que promoveu a mudança na morfologia.

Todas essas alterações morfológicas mostram que a indução da deficiência do complexo I prejudicou a dinâmica mitocondrial. A dinâmica mitocondrial nas fibras musculares esqueléticas desempenha diferentes papéis funcionais, contribuindo tanto para a função mitocondrial normal bem como para a fisiologia do músculo esquelético (CHEN et al., 2010). Por exemplo, a deficiência em Mfn1 (mitofusina 1) e Mfn2 (mitofusina 2) comprometeu de forma crônica a fusão mitocondrial resultando no acúmulo de danos e mutações no mtDNA, depleção do mtDNA e comprometimento da capacidade respiratória máxima que no músculo esquelético de camundongos (CHEN; CHAN, 2010). Dessa forma, além do papel da dinâmica mitocondrial de

permitir a troca de conteúdo entre as mitocôndrias e manter o número de organelas funcionais, um nível adequado de fusão mitocondrial parece ser essencial para preservar a função do mtDNA (CHEN; CHAN, 2010).

Dessa forma, após demonstrar que o quadríceps de animais tratados com a reserpina tiveram alterados parâmetros mitocondriais que evidenciaram adaptações de dinâmica mitocondrial induzidas por disfunções no metabolismo, o próximo passo para comprovar a hipótese do trabalho foi a quantificação das concentrações de BH4 nos tecidos e fluídos desses animais. As menores concentrações de BH4 tanto no estriado quanto nos fluídos biológicos de animais tratados com reserpina demonstram uma possível relação entre a deficiência mitocondrial e a produção de BH4. Esta é a primeira vez que este tipo de estudo tem sido realizado, demonstrando alterações mitocondriais de dinâmica e fisiologia associadas às concentrações teciduais e extracelulares de BH4. Um estudo demonstrou alterações na dinâmica mitocondrial em tecido cardíaco com deficiência em BH4 (KIM et al., 2019), embora o trabalho tenha sido realizado em tecido cardíaco, o músculo quadríceps também é estriado e oxidativo e assim é plausível de realizar comparações.

Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa já demonstraram que células imunes com deficiência na síntese de BH4 (animal nocaute para o gene que codifica para GTPCH – enzima limitante do fluxo de síntese de BH4 –, ou células tratadas com SPRI3 e QM385 – inibidores farmacológicos da síntese de BH4 –) apresentam prejuízos na expansão celular e infiltração nos tecidos por falhas na produção de ATP (CRONIN et al., 2018). Essa disfunção mitocondrial foi caracterizada por aumento de EROS, diminuição da respiração celular e do ferro mitocondrial (necessário para a formação dos complexos da cadeia respiratória) e aumento nas concentrações de lactato e piruvato (CRONIN et al., 2018). Ainda, foi observado que a reposição das concentrações intracelulares de BH4, restaurou a síntese de ATP e a resistência contra o estresse oxidativo (CRONIN et al., 2018). Outro trabalho do nosso grupo demonstrou que um animal com deficiência em parkina (modelo experimental da DP induzido geneticamente) apresentou alterações no metabolismo da BH4 (DE PAULA MARTINS et al., 2018b). Considerando que o presente estudo utilizou um sistema de indução química de DP, fica evidenciado que o metabolismo da BH4 se encontra prejudicado em dois sistemas experimentais de DP. Ademais, foi demonstrado que um pré-tratamento com neopterina (subproduto da via de síntese *de novo* da BH4) aumentou a função mitocondrial em células nervosas humanas (DE PAULA MARTINS

et al., 2018a). Dessa forma, já existem evidências de que um subproduto da via da BH4 pode ser benéfico para melhora da função mitocondrial.

Após a nossa primeira prova conceitual de que a biossíntese da BH4 se encontra prejudicada em uma condição na qual a deficiência mitocondrial foi induzida quimicamente em animais, o passo seguinte foi investigar o metabolismo da BH4 em uma condição de deficiência mitocondrial genética em células humanas. Para isso foram utilizados fibroblastos provenientes de indivíduos com deficiência no gene DARS2 que apresentaram sinais compatíveis com a doença LBSL. O ponto de partida foi investigar como estava a atividade mitocondrial nos fibroblastos deficientes em DARS2. Foi demonstrada uma diminuição da atividade dos complexos I e IV da cadeia respiratória. Esses resultados estão de acordo com as deficiências nas atividades dos complexos I, II e IV descritos em tecido cerebral e músculos estriados (esquelético e cardíaco) de animais com nocautes condicionais para DARS2 (ARADJANSKI et al., 2017; DOGAN et al., 2014).

A atividade do complexo II não se mostrou alterada nos fibroblastos deficientes em DARS2, no entanto, é de esperar que não existam inibições neste complexo mitocondrial, visto que a síntese das proteínas constituintes deste complexo mitocondrial estão todas codificadas pelo nDNA (Nelson 2019). Considerando que mutações globais do gene DARS2 são letais em animais ainda em desenvolvimento embrionário (DOGAN et al., 2014), o estudo em fibroblastos deficientes em DARS2 representa de um substrato biológico de fácil acesso para identificar novas substâncias farmacológicas para tratamento dessa condição.

O segundo passo para investigar a função mitocondrial e o metabolismo da BH4 nos fibroblastos deficientes em DARS foi analisar o transcriptoma global com o intuito de observar se o metabolismo da BH4 se encontraria alterado. A transcriptômica utilizando o sequenciamento de nova geração permite a análise da expressão de transcritos em diferentes condições fisiológicas e patológicas. Esta possibilidade metodológica expande o entendimento da relação entre o transcriptoma e o fenótipo de um organismo (MILWARD, HONDERMARCK, 2016), permitindo a análise da modulação de vias metabólicas em condições patológicas e possibilitando a detecção de padrões de expressão em vias específicas (LIANG et al., 2013).

Os resultados da análise de expressão diferencial dos genes em fibroblastos deficientes em DARS2 identificou um total de 717 genes diferencialmente expressos, sendo a maioria, 488, regulados negativamente. Entre os genes regulados

positivamente em fibroblastos deficientes em DARS2 estão genes relacionados com processos de endocitose e *splicing*, enquanto os regulados negativamente com processos de formação estrutural celular. Resultados semelhantes já foram descritos através do sequenciamento de célula única em iPSC obtidas de indivíduos afetados por LBSL. O estudo identificou 736 genes diferencialmente expressos e o processo de *splicing* se encontrou também regulado positivamente (GUANG et al., 2023). A expressão desregulada de genes que codificam proteínas do spliceossomo pode sugerir que eventos de *splicing* podem estar relacionados com ao menos alguns dos mecanismos fisiopatológicos em LBSL.

Ao ser realizada uma análise de enriquecimento desses genes expressos diferencialmente foram encontradas enriquecidas vias como a do processo de fosforilação oxidativa e vias que estimulam a glicólise. Quanto aos processos biológicos enriquecidos, se destacaram processos envolvendo a resposta a baixos níveis de oxigênio. Essas adaptações celulares também foram identificadas em iPSC de LBSL estando de acordo com que a deficiência mitocondrial causada pela mutação no gene DARS2 provoca alterações negativas na cadeia respiratória, resultando em comprometimento da respiração celular. Além disso é possível destacar que o gene ND4 se encontrou regulado negativamente nas iPSC, sendo um gene essencial para a atividade catalítica e montagem do complexo I (NEWMAN et al., 2021), evidenciando mais uma vez que o complexo I está prejudicado em LBSL.

Após analisar o transcriptoma global dos fibroblastos dos participantes do nosso estudo foi feita uma busca específica de como estava regulada a expressão dos genes envolvidos na via de síntese da BH4. Foi demonstrado que todos os genes envolvidos na biossíntese da BH4 apresentavam um valor de expressão de $\log_2\text{foldchange}$ negativo. Apesar de não apresentarem valores significativos ($\log_2\text{FoldChange} < -1$ e $\text{padj} < 0,05$) esse valor tem sido usado como ponto de corte para distinguir a expressão diferencial na maior parte dos estudos publicados (YANG et al., 2002). O presente estudo também contou com a limitação de um baixo número de amostras, dificultando a execução das comparações. Entretanto por se tratar de amostras humanas de indivíduos acometidos por uma doença autossômica recessiva rara causada por mutações no gene DARS2 (SCHEPER et al., 2007) os achados se tornam relevantes.

Apesar da análise de expressão diferencial dos genes envolvidos na biossíntese da BH4 não apresentarem valores significativos, ao serem comparados

os níveis de expressão dos fibroblastos deficientes em DARS2 com o controle em um mapa de calor, utilizando o método WardD2, foi constatado que os indivíduos deficientes em DARS2 mostraram valores de expressão negativa dos genes envolvidos na via de síntese da BH4 em comparação com o controle. O método WardD2 define a distância entre dois clusters como o valor máximo de todos os pareamentos entre os elementos do cluster 1 e os elementos do cluster 2 (KASSAMBARA, 2017). Também é possível destacar que o indivíduo afetado por LBSL que se apresentou sintomático demonstrou valores mais negativos de expressão que o indivíduo assintomático, demonstrando ser possível uma relação de gravidade da doença e os níveis de síntese de BH4.

Para comprovar os achados gerados pela análise do transcriptoma foi realizado um qPCR para analisar a expressão relativa do gene *GCH1* nos fibroblastos deficientes em DARS2, uma vez que esse gene codifica para a enzima GTPCH, enzima limitante da biossíntese da BH4 (THÖNY; AUERBACH; BLAU, 2000). Os resultados demonstraram que o indivíduo sintomático apresentou expressão de *GCH1* significativamente menor em relação ao controle, enquanto que o indivíduo assintomático não demonstrou diminuição na expressão do gene. Esse resultado pode ser uma possível explicação para a expressão diferencial do gene *GCH1* não ter resultado em valores significativos, uma vez que na análise de expressão diferencial as comparações foram realizadas em fibroblastos deficientes em DARS2 como um único grupo e não individualmente (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Ademais, esse resultado se mostra como mais uma possível demonstração de que há uma relação entre os níveis de BH4 e a gravidade da doença, uma vez que o indivíduo sintomático apresentou significativa redução da expressão de *GCH1* enquanto o assintomático não apresentou diferenças na expressão em comparação com o controle.

O passo seguinte foi analisar a atividade da enzima GTPCH, codificada pelo *GCH1* (THÖNY; AUERBACH; BLAU, 2000). Em condições basais não foram encontradas diferenças na atividade enzimática entre o controle e os fibroblastos afetados pela mutação no gene DARS2. Entretanto, ao ser analisada a atividade enzimática na presença de LPS, um dos principais ativadores da transcrição de *GCH1* (BAUER et al., 2002), foi demonstrado um aumento na atividade da enzima apenas no controle, mas não nos fibroblastos deficientes em DARS2. Isso sugere que fibroblastos deficientes em DARS2 não podem atender demandas de uma maior síntese de BH4 em situações de estresse celular, ocasionado um prejuízo secundário

nos sistemas que necessitam do cofator para o funcionamento celular. Também é possível notar que o indivíduo assintomático apresentou uma diferença menor em relação ao controle, mostrando mais uma vez que a gravidade da doença pode estar relacionada com os níveis da BH4.

Como um último passo também foi analisada a presença de polimorfismos do gene *GCH1* nos fibroblastos deficientes em DARS2, uma vez que tem sido demonstrado que existem polimorfismos do gene que estão relacionados com um menor produção de BH4. O haplótipo funcional do gene *GCH1*, ATG (rs8007267-rs3783641-rs10483639), está associado à menor expressão do gene *GCH1*, menor disponibilidade plasmática e vascular de BH4 e resultados adversos à saúde (TEGEDER et al., 2006; ANTONIADES, 2008). O haplótipo pode ser determinado por três SNPs: rs8007267; rs3783641 e rs10483639 (Lupo et al 2012). Nesse trabalho foi investigada a presença de dois dos SNPs do haplótipo, o rs8007267, rs378364. Entretanto nos fibroblastos deficientes em DARS2 só foi identificado o alelo T em homozigose para o SNP rs3783641, não estando presente o alelo A no SNP rs8007267, portanto os indivíduos não apresentaram o haplótipo relacionado com menor produção de BH4. Esses resultados demonstrando que os fibroblastos deficientes em DARS2 não possuem o haplótipo do gene *GCH1* relacionado com uma menor produção de BH4 podem significar que as perturbações no metabolismo da BH4 não são em decorrência de mecanismos genéticos intrínsecos da via de biossíntese, mas estão associadas diretamente com a mitocôndria. Dessa forma, a integridade e o correto funcionamento da mitocôndria seriam essenciais para manutenção do metabolismo da BH4. Entretanto novos estudos com maior número de amostras são necessários para corroborar com esses achados.

A utilização de fibroblastos para caracterizar o comprometimento mitocondrial na deficiência de DARS2 é relevante uma vez que as culturas celulares podem ser utilizadas como ferramentas valiosas e acessíveis para a identificação de potenciais novos tratamentos para DMP. Além disso, essas células também podem ser reprogramadas com sucesso para se tornarem iPSC, oferecendo a oportunidade de gerar linhas celulares específicas ajudando a modelar doenças humanas. Somando-se a isso, os fibroblastos da pele, são fáceis de coletar e altamente proliferativos, fornecendo uma fonte renovável de células. Diante disso, os fibroblastos derivados de uma deficiência de DARS2 apresentaram uma valiosa ferramenta de pesquisa para a compreensão de sua fisiopatologia e para o desenvolvimento de novos tratamentos.

Diante dos achados, foi demonstrado que em condição de deficiência adquirida quimicamente a disfunção mitocondrial cursa com uma diminuição dos níveis da BH4. Também foi demonstrado que em condição genética de disfunção mitocondrial o metabolismo da BH4 se encontra prejudicado, ressaltando-se que foram encontradas diferenças nos resultados no indivíduo sintomático e no indivíduo assintomático, mostrando uma possível relação entre um metabolismo da BH4 prejudicado e a gravidade da doença/deficiência mitocondrial. Diante desses fatos é possível propor que a suplementação para obter a recuperação de níveis fisiológicos de BH4 poderia ser uma nova alternativa de tratamento que poderia aumentar a qualidade de vida dos indivíduos afetados por disfunções mitocondriais. Considerando que a BH4 é aprovada pelo FDA desde 2007 para tratamento de fenilcetonúria (www.accessdata.fda.gov, acessado em 16 de janeiro de 2024, número de aplicação ND 022181) e tem sido administrada em milhares de indivíduos, incluindo crianças, sem efeitos secundários importantes (MUNTAU et al., 2021) essa se torna uma opção viável de tratamento. Além disso, o tratamento com a administração de BH4 tem sido usado em ensaios clínicos para doenças cardíacas, pulmonares, reumatológicas, dérmicas e psiquiátricas, demência, menopausa, envelhecimento e doenças hereditárias. Todos esses ensaios clínicos são publicados em [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) e foram baseados na segurança da administração da BH4 (MUNTAU et al., 2021).

8 PERSPECTIVAS

Pretende-se explorar o metabolismo da BH4 em diversos distúrbios mitocondriais de origem genética, com o intuito de determinar se o comprometimento metabólico da BH4 persiste em diferentes deficiências energéticas. Além disso, se anseia conduzir investigações futuras que envolvam o tratamento com BH4, ou seus precursores, como a sepiapterina, em células e/ou animais que apresentem alguma disfunção mitocondrial. Esse delineamento experimental permitiria avaliar se a administração de BH4 desempenha um papel causal na melhora da função mitocondrial, bem como investigar os mecanismos subjacentes a esse processo.

9 CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho demonstraram uma estreita relação entre disfunção mitocondrial e déficits na biossíntese da BH4, que parece estar associado à gravidade da deficiência mitocondrial. Dessa forma, se torna plausível sugerir que a suplementação com BH4 pode ser uma inovadora estratégia terapêutica para melhora das funções mitocondriais, visando a cura ou uma melhora na qualidade de vida dos indivíduos afetados pelas DMP.

10 REFERÊNCIAS

ADHINETTY, P. J. et al. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 289, n. 4 58-4, p. 994–1001, 2005.

AGUIAR, A. S. et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 452–457, 2009.

ALBERTS, B. et al. (Orgs.). *Biologia Molecular da Célula* - 6º Ed. 2017, Ed. Artes Médicas, Porto Alegre.

ANDREWS S. FastQC: a quality-control tool for high-throughput sequence data. Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom, 2010. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>.

ANTONIADES. GCH1 Haplotype Determines Vascular and Plasma Biopterin Availability in Coronary Artery Disease. **J Am Coll Cardiol**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

ARADJANSKI, M. et al. DARS2 protects against neuroinflammation and apoptotic neuronal loss, but is dispensable for myelin producing cells. **Human Molecular Genetics**, 2017.

ASHBURNER. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **nature America**, v. 24, n. 19, p. 2121–2128, 2000.

BAILEY, J. et al. A novel role for endothelial tetrahydrobiopterin in mitochondrial redox balance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, n. September 2016, p. 214–225, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.012>>.

BANDY, B.; DAVISON, A. J. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: Implications for carcinogenesis and aging? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 6, p. 523–539, 1990.

BARRIENTOS, A. et al. Cytochrome oxidase in health and disease. [Review] [68 refs]. **Gene**, v. 286, n. 1, p. 53–63, 2002.

BAUER, M. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor up-regulates GTP-cyclohydrolase I activity and tetrahydrobiopterin levels in primary dopaminergic neurones. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, n. 5, p. 1300–1310, 2002.

BINDOFF, L. A. et al. Mitochondrial Function in Parkinson'S Disease. **The Lancet**, v. 334, n. 8653, p. 49, 1989.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; STOPPANI, A. O. M. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**, v. 156, n. 2, p. 435–444, 1976.

BRUM, E. da S. et al. Relevance of Mitochondrial Dysfunction in the Reserpine-Induced Experimental Fibromyalgia Model. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 10, p. 4202–4217, 2020.

CAPALDI, R. A. Structure and function of Cytochrome c oxidase. **Annu. Rev. Biochem**, v. 59, p. 569–96, 1990.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527–605, 1979.

CHEN, H. et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 280–289, 2010.

CHEN, H.; CHAN, D. C. Physiological functions of mitochondrial fusion. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1201, p. 21–25, 2010.

CHEN, H.; MCCAFFERY, J. M.; CHAN, D. C. Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 548–562, 2007.

CHEN, Q. et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 38, p. 36027–36031, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M304854200>>.

CHINNERY, P. F. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. **American**

Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics, v. 106, n. 1, p. 94–101, 2001.

CRABTREE, M. J.; CHANNON, K. M. Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 81–88, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2011.04.004>>.

CRONIN, S. J. F. et al. The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer. **Nature**, v. 563, n. 7732, p. 564–568, 2018a.

CRONIN, S. J. F. F. et al. The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer. **Nature**, v. 563, n. 7732, p. 564–568, nov. 2018b.

DE PAUL, A. L. et al. Cellular and functional interactions between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cell cultures. **Medical Electron Microscopy**, v. 33, n. 4, p. 231–240, 2000.

DE PAULA MARTINS, R. et al. Neopterin preconditioning prevents inflammasome activation in mammalian astrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 115, n. March 2017, p. 371–382, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.022>>.

DE PAULA MARTINS, R. et al. De novo tetrahydrobiopterin biosynthesis is impaired in the inflamed striatum of parkin(–/–) mice. **Cell Biology International**, v. 42, n. 6, p. 725–733, 2018b.

DELGADO-ESTEBAN, M.; ALMEIDA, A.; MEDINA, J. M. Tetrahydrobiopterin deficiency increases neuronal vulnerability to hypoxia. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, n. 5, p. 1148–1159, set. 2002.

DI DONATO, S. Disorders related to mitochondrial membranes: Pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 23, n. 3, p. 247–263, 2000.

DOBIN, A.; GINGERAS, T. R.; SPRING, C.; FLORES, R.; SAMPSON, J.; KNIGHT, R.; CHIA, N.; TECHNOLOGIES, H. S. Mapping RNA-seq with STAR. **Curr Protoc**

Bioinformatics, v. 51, n. 4, p. 586–597, 2016.

DOGAN, S. A. et al. Tissue-specific loss of DARS2 activates stress responses independently of respiratory chain deficiency in the heart. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 458–469, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.004>>.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

DURINCK S. ET AL. Mapping identifiers for the Integration of Genomic Datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. **Nat Protoc.**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2009.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1357–1391, 2011.

DUVOISIN, R. C.; MARSDEN, C. D. Reversal of reserpine-induced bradykinesia by amethyldopa - new light on its modus operandi. **Brain Research**, v. 71, n. 1, p. 178–182, 1974.

EICHWALD, T. et al. Tetrahydrobiopterin: Beyond Its Traditional Role as a Cofactor. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, p. 1–27, 2023.

GENTLEMAN, R. C. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome biology**, v. 5, n. 10, 2004.

GHISONI, K. et al. Neopterin as a potential cytoprotective brain molecule. **Journal of Psychiatric Research**, v. 71, p. 134–139, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.10.003>>.

GHISONI, K. et al. Neopterin acts as an endogenous cognitive enhancer. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 56, p. 156–164, 2016.

GOMES, L. C.; BENEDETTO, G. Di; SCORRANO, L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 589–598, 2011.

GORMAN, G. S. et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related

- to adult mitochondrial disease. **Annals of Neurology**, v. 77, n. 5, p. 753–759, 2015.
- GORMAN, G. S. et al. Mitochondrial diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–23, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>>.
- GUANG, S. et al. Mutations in DARS2 result in global dysregulation of mRNA metabolism and splicing. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-023-40107-7>>.
- HAUSLADEN, A.; FRIDOVICH, I. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 47, p. 29405–29408, 1994.
- HIRAKAWA, H. et al. Expression analysis of the Aldo-keto reductases involved in the novel biosynthetic pathway of tetrahydrobiopterin in human and mouse tissues. **Journal of Biochemistry**, v. 146, n. 1, p. 51–60, 2009.
- HUANG, W. L. et al. Leukoencephalopathy with Brain stem and Spinal cord involvement and Lactate elevation (LBSL): Report of a new family and a novel DARS2 mutation. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 38, n. November 2023, p. 101025, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2023.101025>>.
- IWAYAMA, T; FLEMING, W; BURNSTOCK, G. Ultrastructure of mitochondria in atrial muscle associated with depression and supersensitivity produced by reserpine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 184, n. 95–105, 1973.
- JOHNSON, M. A. et al. Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 18, n. 1, p. 111–129, 1973.
- KANEHISA, M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 4, p. 3316–3332, 2000.
- KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Structure-activity relationship of antioxidants for inhibitors of linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Cytotechnology**, v. 35, n. 1, p. 43–55, 2001.
- KANEKO, Y. S. et al. Peripheral administration of lipopolysaccharide enhances the

expression of guanosine triphosphate cyclohydrolase I mRNA in murine locus coeruleus. **Neuroscience**, v. 116, n. 1, p. 7–12, 2003.

KASSAMBARA, A. Multivariate Analysis I: Practical Guide To Cluster Analysis in R. Unsupervised Machine Learning. **Taylor & Francis Group**, p. 188, 2017.

KAYAR, S. R. H. H.-G. B. S. K. The similarity of mitochondrial distribution on equine skeletal muscles of differing oxidative capacity. v. d, p. 253–263, 1988.

KIM, H. K. et al. Tetrahydrobiopterin enhances mitochondrial biogenesis and cardiac contractility via stimulation of PGC1 α signaling. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 11, p. 165524, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.07.018>>.

KIM, H. L. et al. Tetrahydropteridine deficiency impairs mitochondrial function in Dictyostelium discoideum Ax2. **FEBS Letters**, v. 581, n. 28, p. 5430–5434, 2007.

KIRKWOOD, S. P.; MUNN, E. A.; BROOKS, G. A. Mitochondrial reticulum in limb skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 251, n. 3 (20/3), 1986.

KWAK, S. S. et al. Autophagy induction by tetrahydrobiopterin deficiency. **Autophagy**, v. 7, n. 11, p. 1323–1334, 2011.

LATINI, A. et al. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, n. 1–2, p. 188–199, 2005.

LATINI, A. et al. Tetrahydrobiopterin improves hippocampal nitric oxide-linked long-term memory. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 125, n. 1–2, p. 104–111, 2018.

LATREMOLIERE, A. et al. Reduction of Neuropathic and Inflammatory Pain through Inhibition of the Tetrahydrobiopterin Pathway. **Neuron**, v. 86, n. 6, p. 1393–1406, jun. 2015a.

LATREMOLIERE, A. et al. Reduction of Neuropathic and Inflammatory Pain through Inhibition of the Tetrahydrobiopterin Pathway. **Neuron**, v. 86, n. 6, p. 1393–1406, jun.

2015b.

LEVINE, R. A. et al. Immunological Evidence for the Requirement of Sepiapterin Reductase for Tetrahydrobiopterin Biosynthesis in Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, n. 4, p. 1218–1224, 1990.

LIANG, S. et al. A novel function prediction approach using protein overlap networks. **BMC Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <BMC Systems Biology>.

LIGHTOWLERS, R. N.; TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1494–1499, set. 2015.

LINNANKIVI, T. et al. Five new cases of a recently described leukoencephalopathy with high brain lactate. **Neurology**, v. 63, n. 4, p. 688–692, ago. 2004.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 1–21, 2014.

LUPO, P. J. et al. A GCH1 haplotype and risk of neural tube defects in the National Birth Defects Prevention Study. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 107, n. 3, p. 592–595, 2012.

MARTIKAINEN, M. H.; ELLFOLK, U.; MAJAMAA, K. Impaired information-processing speed and working memory in leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and elevated lactate (LBSL) and DARS2 mutations: A report of three adult patients. **Journal of Neurology**, v. 260, n. 8, p. 2078–2083, 2013.

MAYER, B.; JOHN, M.; BÖHME, E. Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. **FEBS Letters**, v. 277, n. 1–2, p. 215–219, 1990.

MEYER, M.; KIRCHER, M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 5, n. 6, 2010.

MÜLLER, W. Subsarcolemmal mitochondria and capillarization of soleus muscle fibers in young rats subjected to an endurance training - A morphometric study of semithin sections. **Cell and Tissue Research**, v. 174, n. 3, p. 367–389, 1976.

MUNTAU, A. C. et al. Long-term efficacy and safety of sapropterin in patients who initiated sapropterin at < 4 years of age with phenylketonuria: results of the 3-year extension of the SPARK open-label, multicentre, randomised phase IIIb trial. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13023-021-01968-1>>.

MUTHIAH, A. et al. The Leukodystrophies HBSL and LBSL Correlates and Distinctions. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, p. 1 - 18, 2021.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014

NEWMAN, N. J. et al. Intravitreal Gene Therapy vs. Natural History in Patients With Leber Hereditary Optic Neuropathy Carrying the m.11778G>A ND4 Mutation: Systematic Review and Indirect Comparison. **Frontiers in Neurology**, v. 12, n. May, 2021.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu,Zn-SOD in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38388–38393, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M105395200>>.

ORPHANET. Síndrome de leucoencefalopatia com envolvimento do tronco cerebral e medula-lactato aumentado. Orphanet Enciclopédia, Novembro, 2023, Disponível em: <https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/PT/Prevalencia_das_doencas_raras_por_prevalencia_decrescente_ou_casos.pdf>

PALMER, J. W.; TANDLER, B.; HOPPEL, C. L. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 23, p. 8731–8739, 1977. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)75283-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)75283-1)>.

PARIKH, S. et al. Diagnosis and management of mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 9, p. 689–701, set. 2015.

PEARSON, K. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space . **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, v. 2, n. 11, p. 559–572, 1901.

POLI, G.; SCHAUR, R. J. 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4–5, p. 315–321, 2000.

PREDIGER, R. D. S.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R. N. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 16, n. 4, p. 209–218, 2005.

R CORE TEAM (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAMBOLD, A. S. et al. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 25, p. 10190–10195, 2011.

RAMBOLD, A. S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. **Cell Cycle**, v.10, n. 23, p. 4032–4038, 2011.

RIVERA, J. C. et al. Tetrahydrobiopterin (BH4) deficiency is associated with augmented inflammation and microvascular degeneration in the retina. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2017.

SARASTE, M. Structural features of cytochrome oxidase. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 23, n. 4, p. 331–366, 1990.

SCHAPIRA, A. H. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **The Lancet**, v. II, p. 1985, 1989.

SCHAPIRA, A. H. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.

Advances in neurology, v. 60, p. 288–291, 1990.

SCHAPIRA, A. H. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 1, p. 97–109, 2008.

SCHEPER, G. C. et al. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. **Nature Genetics**, v. 39, n. 4, p. 534–539, 2007.

SERKOV, S. V. et al. Five Patients with A Recently Described Novel Leukoencephalopathy with Brainstem and Spinal Cord Involvement and Elevated Lactate. **Neuropediatrics**, v. 35, n. 1, p. 1–5, fev. 2004.

SERVAIS, S. et al. Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 1, p. 24–32, 2003.

SILVA, R. H. et al. Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. **Behavioural Brain Research**, v. 132, n. 2, p. 171–177, 2002.

SISSLER, M.; GONZÁLEZ-SERRANO, L. E.; WESTHOF, E. Recent Advances in Mitochondrial Aminoacyl-tRNA Synthetases and Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 8, p. 693–708, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2017.06.002>>.

SKULACHEV, V. P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 1, p. 23–29, 2001.

STEENWEG, M. E. et al. Early-onset LBSL: How severe does it get? **Neuropediatrics**, v. 43, n. 6, p. 332–338, 2012.

STELZER, G. et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2016, n. June, p. 1.30.1-1.30.33, 2016.

STILES, A. R. et al. Mutations in TFAM, encoding mitochondrial transcription factor A, cause neonatal liver failure associated with mtDNA depletion. **Molecular Genetics**

and Metabolism, v. 119, n. 1–2, p. 91–99, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.07.001>>.

TATHAM, A. L. et al. GTP cyclohydrolase I expression, protein, and activity determine intracellular tetrahydrobiopterin levels, independent of GTP cyclohydrolase feedback regulatory protein expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13660–13668, 2009.

TEGEDER, I. et al. GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. **Nature Medicine**, v. 12, n. 11, p. 1269–1277, nov. 2006.

THÖNY, B.; AUERBACH, G.; BLAU, N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. **Biochemical Journal**, v. 347, n. 1, p. 1–16, 2000.

THORBURN, D. R. Mitochondrial disorders: Prevalence, myths and advances. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 27, n. 3, p. 349–362, 2004.

TILOKANI, L. et al. Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. **Essays in Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 341–360, 2018.

TUPPEN, H. A. L. et al. Mitochondrial DNA mutations and human disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, n. 2, p. 113–128, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.09.005>>.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **The Biochemical journal**, v. 191, n. 2, p. 421–427, 1980.

VAN BERGE, L. et al. Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation: Clinical and genetic characterization and target for therapy. **Brain**, v. 137, n. 4, p. 1019–1029, 2014.

VAN DER KNAAP, M. S. et al. A new leukodystrophy with brainstem and spinal cord involvement and high lactate. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 2, p. 252–258, 2003a.

VAN DER KNAAP, M. S. et al. A new leukodystrophy with brainstem and spinal cord involvement and high lactate. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 2, p. 252–258, fev. 2003b.

- VOET, D.; VOET, J.G. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1995
- VU, T. H.; HIRANO, M.; DIMAURO, S. Mitochondrial diseases. **Neurologic Clinics**, v. 20, n. 3, p. 809–839, ago. 2002.
- WALLACE, D. C. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 4, p. 1405–1412, abr. 2013.
- WERNER-FELMAYER, G. et al. Induction of GTP cyclohydrolase I by bacterial lipopolysaccharide in the rat. **FEBS Letters**, v. 322, n. 3, p. 223–226, 1993.
- WERNER, E. R.; BLAU, N.; THÖNY, B. Tetrahydrobiopterin: Biochemistry and pathophysiology. **Biochemical Journal**, v. 438, n. 3, p. 397–414, 2011.
- WESTERMANN, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 872–884, 2010.
- YANG, I. V. et al. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. **Genome biology**, v. 3, n. 11, p. 1–13, 2002.