

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão heteróloga de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1) de *Aspergillus fumigatus* em células HEK293 com deficiência da citrina**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Laís de Lourdes de Lima Balico

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia no dia 21/11/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

## RESUMO

Balico, L.L.L. Expressão heteróloga de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1) de *Aspergillus fumigatus* em células HEK293 com deficiência da citrina. 2018. 162f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O balanço redox em mitocôndrias de mamíferos é realizado pelo transportador de aspartato-glutamato (AGC), o qual é o principal mecanismo para o movimento de equivalentes redutores na forma de NADH. A citrulinemia do tipo II (CTLN2) é uma doença autossômica recessiva de início tardio, causada por mutações no gene *SLC25A13* que codifica a citrina. A citrina é uma isoforma do transportador AGC e catalisa o transporte de glutamato citosólico através da troca com o aspartato mitocondrial, o qual será utilizado no ciclo da ureia. A CTLN2 promove uma deficiência no ciclo da ureia e consequente hiperamonemia. A deficiência da citrina promove um aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup> citosólica. O aumento dessa razão inibe a glicólise e a gliconeogênese. O desenvolvimento de modelo *in vitro* da CTLN2 é importante para estudos do mecanismo da doença e de novas terapias. A expressão heteróloga de proteínas entre diferentes reinos tem sido utilizado como uma forma de corrigir algumas doenças mitocondriais. Estudos bioquímicos e moleculares em nosso laboratório demonstraram a presença de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1) em *Aspergillus fumigatus*. Ndt1 realiza o transporte de NAD<sup>+</sup> citosólico para a matriz mitocondrial, sendo dessa forma uma proteína importante para manter o balanço redox em *A. fumigatus*. Assim, o objetivo deste trabalho foi obter uma linhagem de células de mamífero HEK293 com *knockdown* para o gene *SLC25A13*, ou seja, um modelo *in vitro* de CTLN2 e a expressão heteróloga da proteína Ndt1 como uma forma de recuperação do metabolismo. As células com *knockdown* para o gene *SLC25A13* apresentaram um aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup> citosólico, redução da glicólise, redução da concentração da ureia e aumento da concentração de amônia. A expressão de Ndt1 foi capaz de reduzir a razão NADH/NAD<sup>+</sup> citosólico e recuperou a atividade glicolítica. Entretanto, a expressão de Ndt1 não foi capaz de aumentar a concentração de ureia e reduzir a concentração de amônia causadas pela CTLN2. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a expressão da proteína Ndt1 em células de mamíferos recupera o metabolismo mitocondrial e atividade glicolítica das células com CTLN2, mas não melhora o ciclo da ureia e o aumento da concentração de amônia.

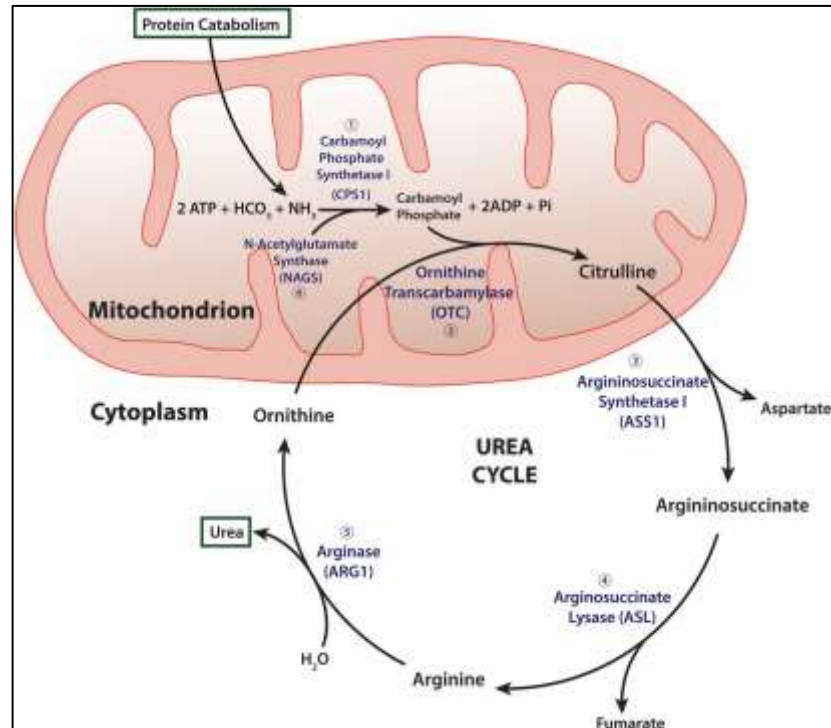
Palavras-chave: Citrulinemia, Mitocôndria, Citrina, Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo, *Aspergillus fumigatus*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Citrulinemia

Em 1962, McMurray e colaboradores descreveram pela primeira vez a citrulinemia, os quais evidenciaram aminoacidúria em indivíduos com desordens neurológicas. Através da análise do perfil cromatográfico observaram um aumento de citrulina na urina e no sangue desses indivíduos. A citrulinemia é uma disfunção metabólica caracterizada principalmente por hiperamonemia e acúmulo de citrulina nos fluidos corporais (Saheki e Kobayashi, 2002), essa doença também é classificada como uma desordem do ciclo da ureia.

O ciclo da ureia é uma via de excreção final de nitrogênio em mamíferos. A ureia apresenta baixa toxicidade aos indivíduos mesmo em altas concentrações, enquanto, a amônia, seu precursor é altamente tóxico (Leonard e Morris, 2002). O ciclo da ureia foi descrito por Hans Krebs e foi o primeiro ciclo biológico descoberto, e ajudou a estabelecer o conceito para a descoberta do ciclo do ácido tricarboxílico [(TCA) Krebs, 1932]. O ciclo da ureia (Figura 1) é muito parecido com o ciclo TCA, possui poucos intermediários, sendo que os quatro intermediários formados são todos  $\alpha$ -aminoácidos e três desses não são encontrados em proteínas, são eles: ornitina, citrulina e argininosuccinato (Krebs, 1932; Watford, 2003). A deficiência ou ausência total de atividade das enzimas do ciclo da ureia leva ao acúmulo de amônia e outros metabólitos nos primeiros dias de vida humanos (Summar, 2001). Entretanto, existem outras proteínas que regulam o ciclo da ureia como a ornitina translocase (ORNT1) e citrina, ambos transportadores mitocondriais, os quais têm sido relacionados a desordens no ciclo da ureia, devido a deficiência desses transportadores.



**Figura 1.** Ciclo da ureia. Adaptado de Blair, Cremer e Tchan, 2015.

A citrulinemia pode ser classificada em três tipos, dependendo do gene envolvido e da idade de início da doença. A citrulinemia do tipo 1 (CTLN1) ou citrulinemia clássica é caracterizada pela deficiência de uma enzima do ciclo da ureia no fígado, a enzima argininosuccinato sintase, que converte citrulina e aspartato em argininosuccinato. Esse tipo de citrulinemia ocorre nos primeiros dias de vida. A deficiência total dessa enzima resulta em altos níveis de citrulina, que pode causar hiperamonemia neonatal e ser fatal para os indivíduos acometidos. A deficiência parcial da enzima resulta em quadros patológicos mais brandos, sendo que alguns pacientes são assintomáticos e outros apresentam apenas episódios repetidos e atenuados de hiperamonemia. A hiperamonemia leve ou crônica pode prejudicar o desenvolvimento intelectual dos indivíduos (Crombez e Cederbaum, 2007).

A colestase intra-hepática neonatal (NICCD), é um tipo de citrulinemia. Causada pela deficiência do transportador citrina e ocorre em recém-nascidos ou crianças. As apresentações clínicas de NICCD em crianças com idade inferior a um ano são diversas, tais como a colestase intra-hepática transitória, hepatomegalia, histórico de baixo peso ao nascer, restrição no crescimento, hipoproteïnemia, disfunção hepática variável. NICCD não é grave, os sintomas geralmente desaparecem após um ano do início do tratamento (Tamamori *et al.*, 2002; Saheki e Song, 2005; Miyazaki *et al.*, 2018).

A citrulinemia do tipo 2 (CTLN2) afeta principalmente adultos de 20 a 50 anos, também é chamada de citrulinemia do tipo 2 de início tardio. A manifestação mais frequente é a hiperamonemia que causa sintomas neurológicos como desorientação, delírios, anormalidade comportamental como agressividade, irritação e hiperatividade; sonolência; perda de memória; tremores agudos; convulsões; coma, podendo evoluir para edema cerebral e morte (Saheki *et al.*, 2004). Os sintomas surgem após o uso de álcool, medicação ou cirurgia, principalmente. Alguns indivíduos que apresentaram NICCD após os 20 anos podem apresentar CTLN2 com graves sintomas neurológicos. Normalmente, ocorre uma fase de transição gradual após a NICCD até o início da CTLN2, no entanto, os sintomas de CTLN2 quando surgem são repentinos (Saheki e Kobayashi, 2002; Saheki e Song, 2005; Miyazaki *et al.*, 2018).

CTLN2 é mais frequente na população japonesa, onde a estimativa é que ocorra 1:100.000-230.000 indivíduos nascidos. Nos últimos anos, outras populações do leste asiático, Oriente Médio, Estados Unidos e Reino Unido têm sido diagnosticadas com essa doença, tornando-a assim uma doença com distribuição pan-étnica (Lu *et al.*, 2005; Dimmock *et al.*, 2007; Palmieri, 2008; Song *et al.*, 2011; Kikuchi *et al.*, 2012; Woo, Park e Lee, 2014).

A CTLN2 é uma doença autossômica recessiva, causada por mutações no gene *SLC25A13*. Este gene possui 160 kb e 18 éxons e está localizado no cromossomo 7q21.3. *SLC25A13* codifica uma proteína denominada citrina que faz parte da família de transportador de solutos 25 (lançadeira malato-aspartato), sendo o membro 13 (Hayasaka *et al.*, 2018). A citrina possui 675 aminoácidos e peso molecular calculado de aproximadamente 74 kDa. A estrutura da citrina possui aproximadamente 78% de identidade com a proteína aralar, presente principalmente no cérebro e descrita inicialmente por Del Arco e colaboradores (1998 e 2000).

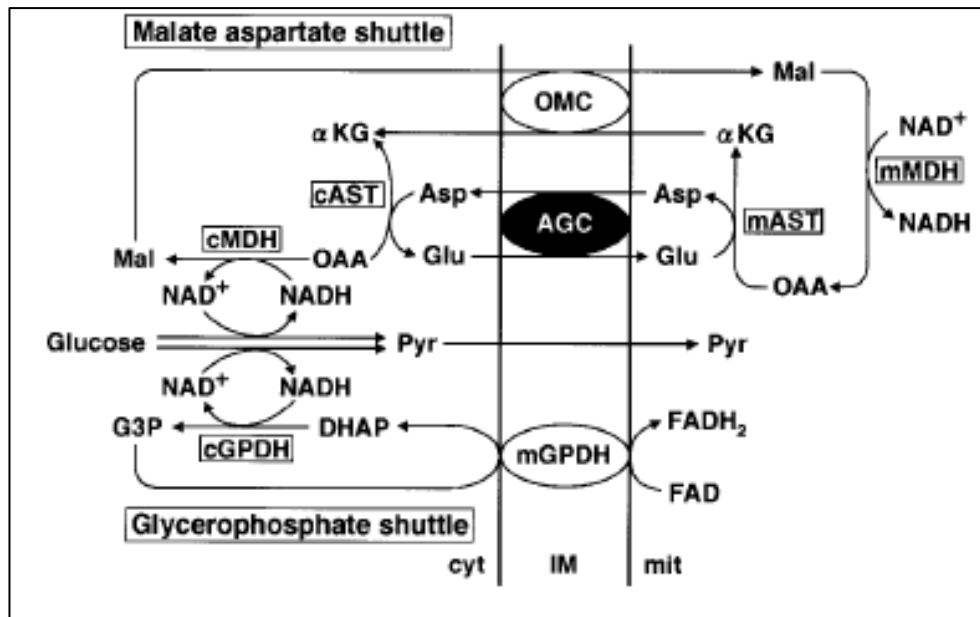
Palmieri e colaboradores (2001) identificaram a citrina e aralar como isoformas do transportador de aspartato glutamato (AGC). Este transportador é um componente da lançadeira malato-aspartato, a qual é um importante transportador de equivalentes redutores para a mitocôndria na forma de NADH. A citrina transporta citrulina da mitocôndria para o citosol. A citrulina e o aspartato são utilizados para síntese de ureia a partir da amônia (Williamson, 1976) e alanina. Dessa forma, a deficiência da citrina causa uma redução da concentração de citrulina e aspartato no citosol, acúmulo de amônia na mitocôndria e bloqueio da síntese de ureia (Figura 1). Além disso, a deficiência da citrina causa alteração na lançadeira malato-aspartato e pode levar a

um aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup> citosólica, causando inibição da glicólise e gliconeogênese, pode também prejudicar o metabolismo de álcool e a lipogênese (Rabier e Kamoun, 1995; Saheki e Kobayashi, 2002; Hayasaka *et al.*, 2018) (Figura 2).

O NAD<sup>+</sup> e seus derivados apresentam um papel central como modulador do metabolismo energético celular. A manutenção das concentrações de NAD<sup>+</sup> e suas isoformas é importante para a manutenção do metabolismo energético e das funções celulares (Ying, 2008; Di Stefano e Conforti, 2013). Em mamíferos, o NADH é capaz de atravessar a membrana mitocondrial externa (Iwata *et al.*, 1998). Entretanto, a membrana mitocondrial interna é impermeável a entrada de NAD<sup>+</sup> e NADH produzidos no citosol (Bonitz *et al.*, 1982). A entrada de moléculas hidrofílicas pela membrana interna é catalisada por uma família de proteínas codificadas no núcleo e denominadas de transportadores mitocondriais, as moléculas transportadas por essa família de proteínas são muito variadas em tamanho e estrutura (Palmieri *et al.*, 2011). Dessa forma, a lançadeira malato-aspartato é a principal responsável pelas alterações na relação NAD<sup>+</sup>/NADH em mamíferos.

No citosol, equivalentes redutores de NADH são transferidos para oxalacetato (OAA) produzindo malato, essa reação é catalisada pela enzima malato desidrogenase citosólica e forma NAD<sup>+</sup>. O malato é transportado para a matriz mitocondrial na troca com  $\alpha$ -cetoglutarato, pelo transportador malato- $\alpha$ -cetoglutarato. Na matriz mitocondrial, o malato é oxidado pela malato desidrogenase mitocondrial formando OAA e NADH. O NADH pode transferir elétrons para a cadeia respiratória, enquanto, o OAA é convertido para aspartato pela transaminação com glutamato através da aspartato aminotransferase mitocondrial. O aspartato sai da mitocôndria através do AGC em uma troca eletrogênica por glutamato e um próton. O aspartato citosólico é convertido para OAA pela transaminação com  $\alpha$ -cetoglutarato através da enzima aspartato aminotransferase citosólica, completando o transporte (Bakker *et al.*, 2001; McKenna *et al.*, 2006) (Figura 2).

Para que ocorra glicólise aeróbica o NADH citosólico deve ser oxidado através da participação da lançadeira malato-aspartato. A citrina também participa da glicólise aeróbica, uma vez que essa proteína transporta NADH do citosol para mitocôndria como um membro da lançadeira malato-aspartato (Saheki *et al.*, 2002; Saheki e Kobayashi, 2002).



**Figura 2.** Lançadeira malato-aspartato. Mal – malato; OAA – oxaloacetato; Pyr – piruvato; G3P- glicerol-3-fosfato; DHAP – diidroxiacetona fosfato; Glu – glutamato; Asp – aspartato;  $\alpha$ KG –  $\alpha$ -cetoglutarato; AGC – transportador de aspartato-glutamato; OMC – transportador de oxoglutarato-malato; cMDH e mMDH – malato desidrogenase citosólica e mitocondrial; cGPDH e mGPDH – glicerofosfato desidrogenase citosólica e mitocondrial; cyt – citosol; mit – mitocôndria; IM – membrana mitocondrial interna. Adaptado de Saheki e Kobayashi, 2002.

## 1.2. Mitocôndria

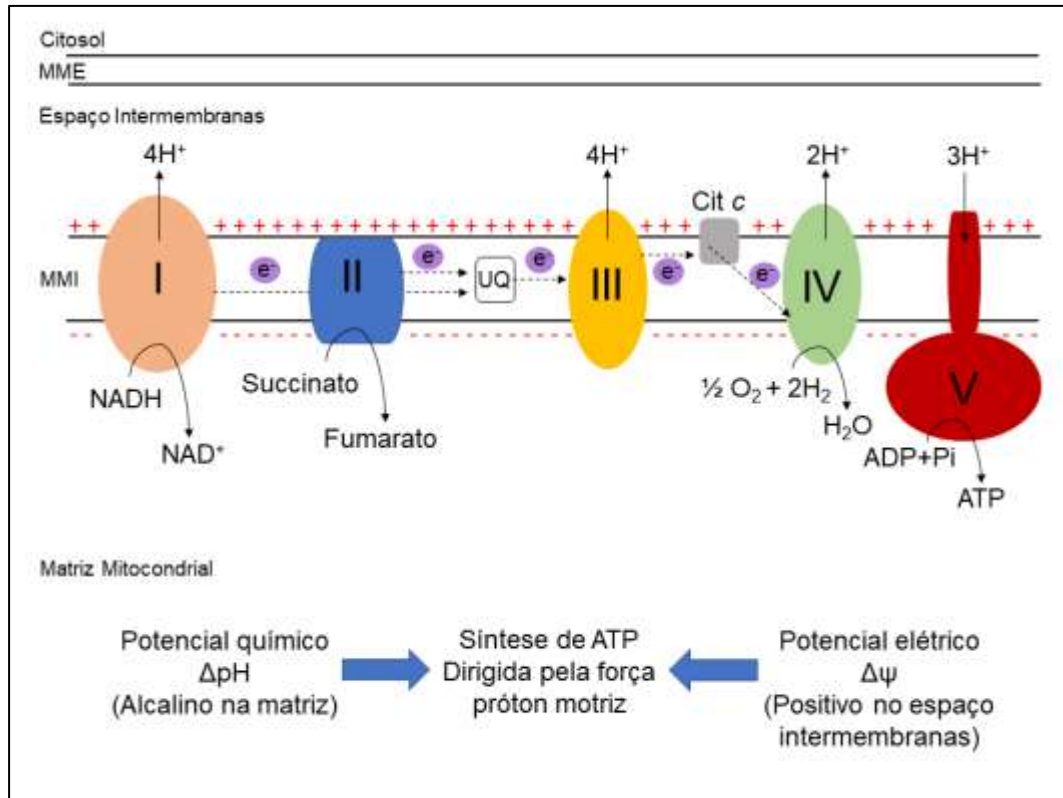
Lynn Margulis propôs a teoria endossimbiótica das organelas (Margulis, 1967), onde a mitocôndria teria se originado de uma endossimbiose de uma  $\alpha$ -protobactéria, um ancestral das células eucarióticas, ocorrido a cerca de 2 bilhões de anos. Essa organela de origem bacteriana foi tolerada e atua como regulador central em inúmeras funções celulares (Archibald, 2015).

A mitocôndria é a organela celular responsável, através da fosforilação oxidativa, pela síntese de aproximadamente 95% do ATP necessário à manutenção da estrutura e função das células (Hatefi, 1985). Além de ser a principal fonte de energia celular, a mitocôndria está relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio [EROs; (Bertero e Maack, 2018)], captação de cálcio (Vercesi *et al.*, 2018), apoptose e autofagia (Hadj-Moussa, Green e Storey, 2018; Farmer, Naslavsky e Caplan, 2018) e como reguladora de células imunológicas (Meyer *et al.*, 2018).

Na mitocôndria ocorre a interconversão da energia redox livre proveniente da oxidação dos substratos respiratórios em energia química, na forma de ATP (Mitchell, 1961). A energização das mitocôndrias, com substratos respiratórios gera um gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta p$ ), cujo potencial elétrico de membrana ( $\Delta \Psi$ ) é

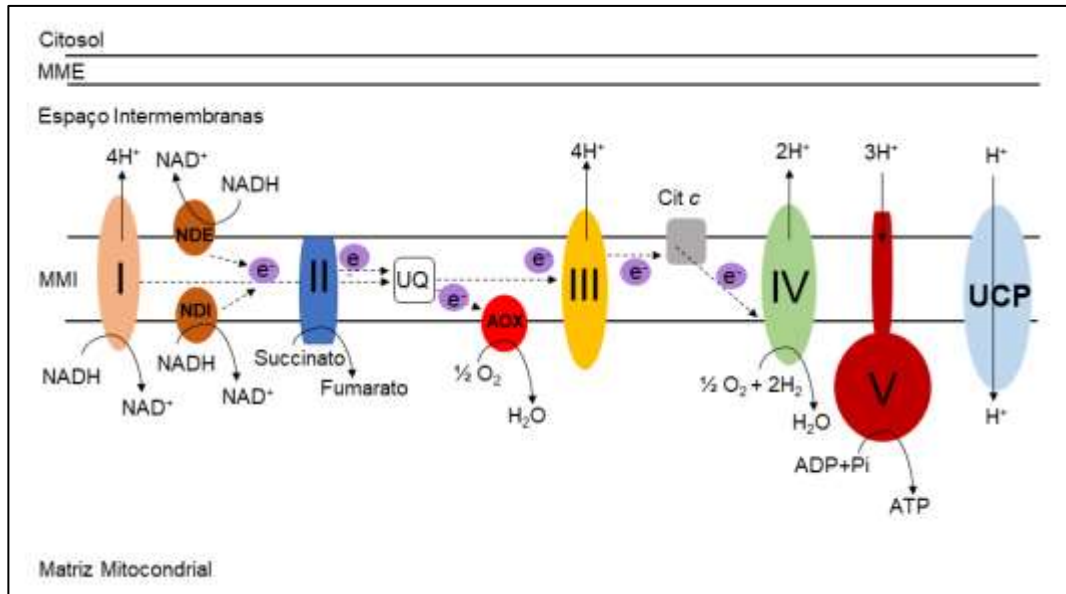
de 0,1 a 0,2 V (negativo na matriz) e cuja diferença de pH ( $\Delta\text{pH}$ ) é de uma unidade (alcalino na matriz). Em mamíferos, o sistema responsável pela fosforilação oxidativa, na membrana mitocondrial interna, é formado por cinco complexos enzimáticos que incluem a cadeia respiratória (complexo I-IV) e a FoF1-ATP sintetase (complexo V). Durante a fosforilação oxidativa, os elétrons são removidos dos substratos oxidáveis pela ação de desidrogenases específicas, ligadas a NADH (substratos de sítio I), e transferidos à cadeia respiratória com subsequente redução do oxigênio molecular. Os equivalentes redutores são transferidos inicialmente a NADH desidrogenase mitocondrial (complexo I). O succinato (substrato de complexo II) é oxidado pela succinato desidrogenase ligada a FAD (complexo II). Os complexos I e II transferem seus elétrons a ubiquinona (UQ), sendo os mesmos transferidos sequencialmente aos complexos III, citocromo *c*, complexo IV e finalmente ao oxigênio, com formação de água. Os elétrons originados da beta oxidação de ácidos graxos são transferidos à cadeia respiratória através da ubiquinona (Boyer *et al.*, 1977; Hatefi, 1985; Lehninger *et al.*, 1993). De acordo com a hipótese quimiosmótica de Mitchell em associação com a do acoplamento conformacional de Boyer, o fluxo de elétrons através dos complexos I, III e IV são acompanhados do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico de  $\text{H}^+$ . A energia livre liberada no retorno do  $\text{H}^+$  à matriz mitocondrial induz alteração conformacional do componente F1 da FoF1-ATP sintetase (complexo V), liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos (Mitchell, 1961; Boyer *et al.*, 1977) (Figura 3).





**Figura 3.** Representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons clássica. MME – membrana mitocondrial externa; MMI – membrana mitocondrial interna; Cit c – citocromo c; UQ – ubiquinona; I – complexo I; II – complexo II; III – complexo III; IV – complexo IV; V – complexo V. Adaptado de Mitchell, 1961.

Fungos, leveduras, plantas e protozoários possuem além da cadeia respiratória clássica, uma proteína desacopladora, a qual pode ser encontrada na maioria dos organismos (Rasmusson e Müller, 2006) e componentes alternativos. A via alternativa está ausente em células de mamíferos. A mitocôndria de *A. fumigatus* foi caracterizada em nosso laboratório, demonstrando a presença de complexos I-V, cadeia respiratória clássica, uma proteína desacopladora (UCP) e a presença da via alternativa (Figura 4): uma NADH-desidrogenase alternativa interna e outra externa, e uma oxidase alternativa mitocondrial (AOX) (Tudella *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Componentes da cadeia transportadora de elétrons, via clássica e alternativa. I – Complexo I; NDE – NAD(P)H desidrogenase alternativa externa; NDI – NAD(P)H desidrogenase alternativa interna; II – Complexo II; UQ – ubiquinona; AOX – oxidase alternativa; III – Complexo III; Cit c – citocromo c; IV – Complexo IV; V – Complexo V; UCP – proteína desacopladora. Adaptado de Mitchell, 1961 e de Rasmusson e Müller, 2006.

As NADH desidrogenases alternativas foram descritas em mitocôndrias de plantas e fungos, catalisando a mesma reação redox do complexo I da via clássica. Essas enzimas transferem o elétron do NADH presente na matriz mitocondrial diretamente para a ubiquinona, porém sem o bombeamento de prótons. Além da presença da NADH desidrogenase voltada para a face interna da membrana mitocondrial interna (Ndi), fungos e plantas podem apresentar uma ou duas NADH desidrogenase alternativa voltadas para a face externa da membrana mitocondrial (Nde). Essa enzima por sua vez, catalisa a transferência de elétrons do NAD(P)H presente no espaço intermembranar para a ubiquinona, contornando novamente o complexo I. As NADH desidrogenase alternativas são insensíveis a rotenona, inibidor clássico do complexo I, mas sensíveis à flavona (Kerscher, 2000; Martins *et al.*, 2011).

A presença da AOX, uma ubiquinol oxidase resistente ao cianeto faz com que essa enzima atue como aceptora final de elétrons. A AOX recebe os elétrons provenientes da ubiquinona e os transfere para o oxigênio, reduzindo até água. A oxidase alternativa é inibida por ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e ácido benzilhidroxâmico (BHAM), porém, resistente ao cianeto, inibidor clássico do complexo IV (Moore e Siedow, 1991; Magnani *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2011).

As UCPs são uma classe de proteínas transportadoras de ânions, localizadas na membrana mitocondrial interna. Essas proteínas estão presentes em mitocôndrias de tecido adiposo marrom e de alguns tecidos não-termogênicos em mamíferos, plantas, fungos e protozoários (Ricquier e Bouillaud, 2000; Jarmuszkiewicz *et al.*, 1999; Uyemura *et al.*, 1999; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2002; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2000; Cavalheiro *et al.*, 2004; Tudella *et al.*, 2004; Luévano-Martinez *et al.*, 2010). As UCPs, como proteínas transportadoras de ânions dissipam o gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons, sem que ocorra a passagem pelo complexo V. A UCP1 após dissipar o gradiente de prótons produz calor ao invés de ATP. Essas proteínas são ativadas por ácidos graxos e sensíveis a nucleotídeos de purina (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011).

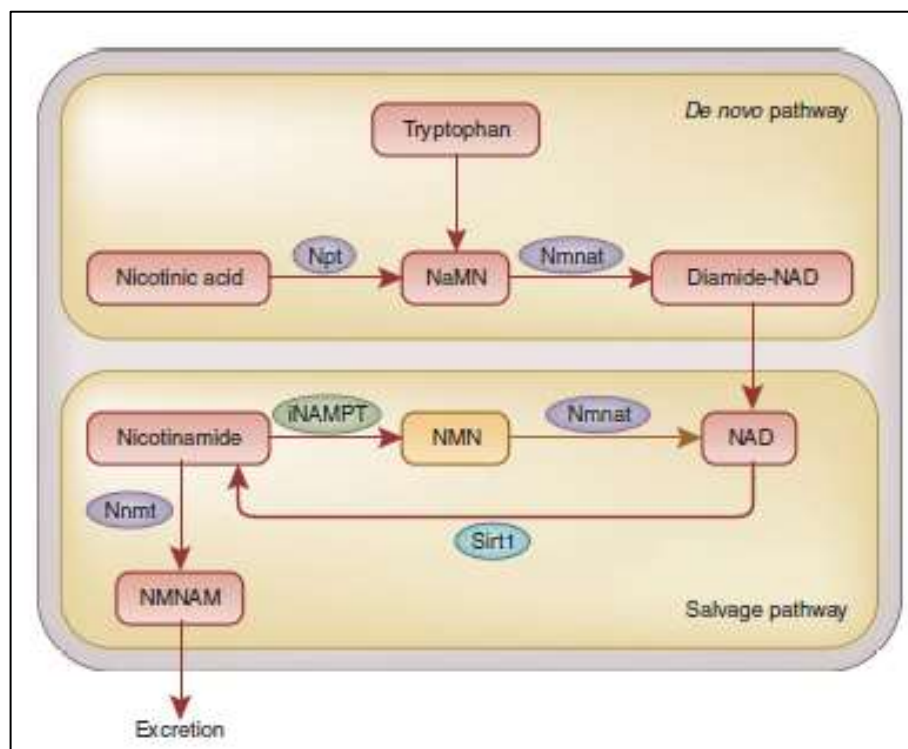
As mitocôndrias além de possuírem papel central no metabolismo energético, são as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória pode ocorrer o escape de elétrons principalmente através do complexo I e III (Vercesi *et al.*, 1997; Kowaltowski *et al.*, 2009). As EROs possuem um papel importante em mecanismos fisiológicos de morte celular e sinalização celular. Essas vias integram completamente os compartimentos celulares e a mitocôndria para uma rápida resposta ativando uma via de sinalização citosólica e, finalmente alterando a expressão gênica no núcleo celular (Yun e Finkel, 2014). Dessa forma, alterações na função mitocondrial têm sido associado a diversos processos fisio-patológicos, como Alzheimer, Parkinson, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, além de atuar também na obesidade e envelhecimento (Finkel e Holbrook, 2000; Wallace, 2005; Amigo *et al.*, 2016; Macdonald *et al.*, 2018; Silzer e Phillips, 2018; Larsen, Hanss e Krüger, 2018; Anderson, Ghiraldeli e Pardee, 2018; de Mello *et al.*, 2018; Panel, Ghaleh e Morin, 2018).

### **1.3. Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1)**

A mitocôndria possui em sua matriz, a coenzima NADH, a qual transfere o hidrogênio do substrato para a cadeia respiratória. O NAD<sup>+</sup> pode estar envolvido em funções regulatórias críticas na transcrição, atividade enzimática e outros importantes processos como ADP-ribosilação e reações de desacetilação (Herrero-Yraola *et al.*, 2001; Onyango *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2003). Além disso, o NAD<sup>+</sup> é um substrato das sirtuínas (SIRT/Sir2, **S**ilent **I**nformation **R**egulator), que pertencem a um grupo de deacetilases NAD<sup>+</sup> dependentes. Estas enzimas removem grupos acetil dos resíduos

de lisina em histonas, microtúbulos e outras proteínas, modulando assim inúmeros eventos celulares (Lin, Kwan e Dutcher, 2010).

As enzimas envolvidas na biossíntese de  $\text{NAD}^+$  estão localizadas fora da mitocôndria (Anderson *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). A via de biossíntese de  $\text{NAD}^+$  foi caracterizada em procariotos (Penfound e Foster, 1996) e em leveduras (Lin e Guarante, 2003; Denu, 2003). Em procariotos e eucariotos inferiores, o  $\text{NAD}^+$  é sintetizado pela via *de novo* do ácido quinolínico e pela via do ácido nicotínico, denominada via *salvage* (Penfound e Foster, 1996). A via *de novo* inicia-se a partir do triptofano, o qual é convertido a ácido nicotínico mononucleotídeo (NaMN) através de seis reações enzimáticas e uma não enzimática. O NaMN converge para a via *salvage* e sofre a ação de duas nicotinamidase formando  $\text{NAD}^+$  (Figura 5). Uma vez sintetizado no citosol, o  $\text{NAD}^+$  deve ser importado para o interior da mitocôndria.



**Figura 5.** Via *de novo* e *salvage* de síntese de  $\text{NAD}^+$ . Npt – ácido nicotínico fosforibosiltransferase; NaMN – ácido nicotínico mononucleotídeo; Nmnat – nicotinamida mononucleotídeo adenililtransferase; NMN – nicotinamida mononucleotídeo; iNAMPT – intracelular nicotinamida fosforibosil-transferase; NMNAM – n-metilnicotinamida; Nnmt – nicotinamida n-metiltransferase. Adaptado de Wakino, Hasegawa e Itoh, 2015.

Em mamíferos, as alterações na relação  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  ocorrem principalmente através da lançadeira malato-aspartato, essa lançadeira é encontrada em inúmeros

tecidos como fígado, rim, coração, cérebro e células  $\beta$ -pancreáticas (Nielsen *et al.*, 2011).

Em fungos, leveduras e plantas, o NADH citosólico pode sofrer oxidação pelas NADH desidrogenases alternativas externas (Martins *et al.*, 2011), e os elétrons são transferidos para a cadeia respiratória. Além disso, estudos identificaram e caracterizaram duas isoformas de proteína transportadora mitocondrial de NAD<sup>+</sup> (Ndt1 e Ndt2) em *Sacharomyces cerevisiae* [(*S. cerevisiae*) Todisco *et al.*, 2006] e em *Arabidopsis thaliana* [(*A. thaliana*) Palmieri *et al.*, 2009] capazes de transportar esses componentes. Estas proteínas possuem massa molecular de aproximadamente 42 e 37,5 kDa para Ndt1 e Ndt2, respectivamente. Os estudos em duplos mutantes  $\Delta ndt1\Delta ndt2$  de *S. cerevisiae* mostrou um severo atraso no crescimento destes mutantes em fontes de carbono não fermentáveis (Todisco *et al.*, 2006).

Estudos prévios em nosso laboratório foi observado que em mitocôndrias de *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), o NAD<sup>+</sup> também induzia a formação de potencial de membrana mitocondrial (Martins *et al.*, 2008), o qual podia ser dissipado por FCCP, sugerindo a presença de um transportador de NAD<sup>+</sup>, conforme havia sido descrito em *S. cerevisiae*. Balico e colaboradores (2017) demonstraram que uma sequência no genoma de *A. fumigatus*, que possui 32% de identidade com o gene do transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (*ndt1*) de *S. cerevisiae*, apresenta a mesma função bioquímica das proteínas Ndt1 de *S. cerevisiae* e *A. thaliana*. Através da expressão heteróloga em *S. cerevisiae* foi confirmado que a proteína Ndt1 de *A. fumigatus* foi capaz de gerar potencial de membrana mitocondrial na presença de NAD<sup>+</sup>, bem como transportar o NAD<sup>+</sup> exógeno para a matriz mitocondrial, em experimentos utilizando mitocôndrias isoladas. Além disso, essa proteína apresentou um papel importante no crescimento e síntese da parede celular das leveduras. Dessa forma, a entrada de NAD<sup>+</sup> do citosol para a mitocôndria por diferentes mecanismos tem sido atribuído como uma forma de resistência dos microrganismos em diferentes ambientes hostis (Amora *et al.*, 2000; Calegario *et al.*, 2003; Hanqing *et al.*, 2010; Kimura *et al.*, 2010).

#### **1.4. Expressão heteróloga de componentes mitocondriais**

As alterações na fosforilação oxidativa decorrentes de deleções ou mutações em genes que codificam proteínas de diferentes vias mitocondriais têm sido descritas

como causa de inúmeras doenças degenerativas, câncer e envelhecimento (Wallace, 1999; Palmieri, 2008; Schon *et al.*, 2010).

As desordens ligadas a erros inatos do metabolismo envolvendo o sistema de fosforilação oxidativa representam uma incidência de 1 em 5.000 nascimentos (Thorburn, 2004). Estas desordens resultam em uma grande variedade de fenótipos clínicos que podem iniciar durante a infância ou na fase adulta. Diferentes órgãos ou tecidos podem ser afetados, especialmente, cérebro, coração e músculo esquelético, os quais utilizam intensamente a fosforilação oxidativa para produção de ATP. Dentre as principais deficiências, as disfunções no complexo I está associado com múltiplas patologias como a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON), Síndrome de Leigh, encefalopatia mitocondrial com acidose láctica e episódios tipo AVC (MELAS), Epilepsia mioclônica com *ragged red fibers* (MERRF), e inclui também as doenças neurodegenerativas como Parkinson (Manickam, Michael e Ramasamy, 2017; Baertling *et al.*, 2017; David *et al.*, 2017; Naini *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2017).

As terapias utilizadas no tratamento dessas doenças apresentam uma eficiência moderada (Wallace, 2005). Desta forma, encontrar estratégias capazes de reverter essas síndromes tem sido discutida. Na última década, tem se demonstrado a possibilidade de substituição de alguma subunidade de componentes da cadeia respiratória que sofreu alterações por uma subunidade “selvagem”, denominado de expressão heteróloga trans-reino. Nesse caso, realiza-se a expressão heteróloga em células humanas de subunidades dos componentes da cadeia respiratória ou outras proteínas mitocondriais provenientes de fungos e plantas.

A expressão da NADH desidrogenase alternativa interna 1 (NDI1) de *S. cerevisiae* em células de mamíferos pode corrigir deficiências no complexo I (Yagi *et al.*, 2006; Yagi *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2006; Marella *et al.*, 2008; Marella *et al.*, 2009). Essa proteína também recuperou o metabolismo de células com mutações que causam neuropatia óptica hereditária de Leber (Park, Li e Bai, 2007). Além disso, a expressão dessa proteína em camundongos não causou resposta imunológica (Marella *et al.*, 2011).

Outra proteína que tem sido estudada utilizando estratégias semelhantes é a AOX, uma proteína encontrada em plantas, protozoários e fungos, a qual também tem sido expressa em linhagens celulares de mamíferos que possuem alguma deficiência do citocromo c oxidase (Dassa *et al.*, 2008; Perales-Clemente *et al.*, 2008; El-Khoury *et al.*, 2013) tentando dessa forma, restaurar a atividade da cadeia respiratória.

O estudo dessas proteínas mitocondriais ainda tem um alto e inexplorado interesse, uma vez que, as mesmas têm mostrado reverter alterações da função mitocondrial e restaurar a cadeia transportadora de elétrons. Assim, compreender a contribuição desses componentes mitocondriais para o metabolismo das células pode ser essencial para avaliar o seu papel nas doenças que causam alteração da bioenergética mitocondrial em humanos. Dessa forma, a expressão do transportador Ndt1 pode contribuir com a melhora no metabolismo das células com citrulinemia, uma vez que o  $\text{NAD}^+$  transportado para as mitocôndrias seria utilizado pelo ciclo de Krebs para sintetizar NADH e este seria utilizado pela cadeia respiratória para geração de ATP.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir:

- A proteína Ndt1 foi expressa e endereçada corretamente para as mitocôndrias das células HEK293;
- O *knockdown* do gene *SLC25A13* que codifica a proteína citrina foi eficiente, reduzindo em 56% a expressão desse gene;
- Nosso modelo *in vitro* da CTLN2 possui algumas das principais características da CTLN2, tais como: aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup>; inibição da glicólise; redução na concentração de ureia e aumento na concentração de amônia;
- A expressão de Ndt1 em células com deficiência da citrina melhorou o metabolismo mitocondrial alterando principalmente:
  - redução da razão NADH/NAD<sup>+</sup>;
  - aumento da respiração mitocondrial;
  - aumento da atividade glicolítica.
- A expressão de Ndt1 e a suplementação do meio de cultura com piruvato 2 mM foi a melhor condição para recuperar o metabolismo mitocondrial e a atividade glicolítica;
- A expressão de Ndt1 não foi capaz de aumentar a concentração de ureia e reduzir a concentração de amônia;
- A expressão heteróloga de Ndt1 pode ser uma alternativa para a CTLN2, uma vez que recupera o metabolismo mitocondrial e a glicólise.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amigo, I.; da Cunha, F.M.; Forni, M.F.; Garcia-Neto, W.; Kakimoto, P.A.; Luévano-Martínez, L.A.; Macedo, F.; Menezes-Filho, S.L.; Peloggia, J.; Kowaltowski, A.J., 2016. Mitochondrial form, function and signalling in aging. *Biochemical Journal*, v. 473, p. 3421-3449.
- Amora, Y.; Chevionb, M.; Levinea, A., 2000. Anoxia pretreatment cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. *FEBS Letters*, v. 477, p. 175-180.
- Anderson, R. M.; Bitterman, K.J.; Wood, J.G.; Medvedik, O.; Cohen, H.; Lin, S.S.; Manchester, J.K.; Gordon, J.I.; Sinclair, D.A., 2002. Manipulation of a nuclear NAD<sup>+</sup> salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD<sup>+</sup> levels. *The Journal of Biological Chemistry*, v.277, p. 18881-18890.
- Anderson, R.G.; Ghiraldeh, L.P.; Pardee, T.S., 2018. Mitochondria in cancer metabolism, an organelle whose time has come? *Biochimica Biophysica Acta – Reviews on Cancer*.
- Archibald, J.M., 2015. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current Biology*, v. 25; R911-R921.
- Baertling, F.; Sánchez-Caballero, L.; van den Brand, M.A.M.; Wintjes, L.T.; Brink, M.; van den Brandt, F.A.; Wilson, C.; Rodenburg, R.J.T.; Nijtmans, L.G., 2017. NDUFAF4 variants are associated with Leigh syndrome and cause a specific mitochondrial complex I assembly defect. *European Journal of Human Genetics*, v. 25, p. 1273-1277.
- Bakker, B. M.; Overkamp, K.M.; van Maris, A.J.; Kötter, P.; Luttik, M.A.; van Dijken, J.P.; Pronk, J.T., 2001. *et al.* Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, v.25, p.15-37.

- Balico, L.L.L.; Santos, E.S.; Suzuki-Hatano, S.; Sousa, L.O.; Azzolini, A.E.C.S.; Lucisano-Valim, Y.M.; Dinamarco, T.M.; Kannen, V.; Uyemura, S.A., 2017. Heterologous expression of mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide transporter (Ndt1) from *Aspergillus fumigatus* rescues impaired growth in  $\Delta ndt1\Delta ndt1$  *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 49, p. 423-435.
- Begum, L.; Jalil, M. A.; Kobayashi, K.; Iijima, M.; Li, M. X.; Yasuda, T.; Horiuchi, M.; del Arco, A.; Satrústegui, J.; Saheki, T., 2002. Expression of three mitochondrial solute carriers, citrin, aralar1 and ornithine transporter, in relation to urea cycle in mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1574, p. 283-292.
- Bergmeyer, H.U., 1985. *Methods of Enzymatic Analysis*. VCH Publishers, v. 9, p. 449-453, Florida.
- Bertero, E.; Maack, C., 2018. Calcium signaling and reactive oxygen species in mitochondria. *Circulation Research*, v. 122, p. 1460-1478.
- Blair, N.F.; Cremer, P.D.; Tchan, M.C., 2015. Urea cycle disorders: a life-threatening yet treatable cause of metabolic encephalopathy in adults. *Practical Neurology*, v. 15, p. 45-48.
- Bonitz, S.G.; Homison, G.; Thalenfels, B.E.; Tzagoloff, A.; Nobrega, F.G., 1982. Assembly of the mitochondrial membrane System: Processing of the apocytochrome *b* precursor RNAs in *Saccharomyces cerevisiae* D273-10B. *The Journal of Biological Chemistry*, v.257, n.11, p.6268-6274.
- Boyer, P. D.; Chance, B.; Ernster, L.; Mitchell, P.; Racker, E.; Slater, E.C., 1977. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Annual Reviews of Biochemistry*, v.46, p.955-1026.

- Calegario, F.F.; Cosso, R.G.; Fagian, M.M.; Almeida, F.V.; Jardim, W.F.; Jezek, P.; Arruda, P.; Vercesi, A.E., 2003. Simulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 35., p. 211-220.
- Cavalheiro, R.A.; Fortes, F.; Borecký, J.; Faustinoni, V.C.; Schreiber, A.Z.; Vercesi, A.E., 2004. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 1455-1461.
- Crombez, E.A.; Cederbaum, S.D., 2007. Urea Cycle Disorders. *Neurology and Clinical Neuroscience*.
- Dassa, E. P.; Dufour, E.; Gonçalves, S.; Paupe, V.; Hakkaart, G. A. J.; Jacobs, H. T.; Rustin, P., 2008. Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. *EMBO Molecular Medicine*, v. 1, p. 30-36.
- David, J.; Okiro, J.O.; Murphy, K.; Elamin, M., 2017. Uncommon mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *BMJ Case Reports*.
- De Mello, A.H.; Costa, A.B.; Engel, J.D.G.; Rezin, G.T., 2018. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Science*, v. 192, p. 26-32.
- Denu, J. M., 2003. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylases. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 28, p.41-48.
- Dimmock, D.; Kobayashi, K.; Iijima, M.; Tabata, A.; Wong, L-J.; Saheki, T.; Lee, B.; Scaglia, F., 2007. Citrin Deficiency: A novel cause of failure to thrive that responds to a high-protein, low-carbohydrate diet. *Pediatrics* 119, e773-e777.

- Di STEFANO, M.; CONFORTI, L., 2013. Diversification of NAD biological role: the importance of location. *The FEBS Journal*, v.280, p. 4711-4728.
- Du, L.; Zhang, X.; Han, Y.Y.; Burke, N.A.; Kochanek, P.M.; Watkins, S.C.; Graham, S.H.; Carcillo, J.A.; Szabó, C.; Clark, R.S., 2003. Intra-mitochondrial poly (ADP-ribosylation) contributes to NAD<sup>+</sup> depletion and cell death induced by oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, v.278, p.18426-18433.
- El-Khoury, R.; Dufour, E.; Rak, M.; Ramanantsoa, N.; Grandchamp, N.; Csaba, Z.; Duvillié, B.; Bénit, P.; Gallego, J.; Gressens, P.; Sarkis, C.; Jacobs, H. T.; Rustin, P., 2013. Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome c oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. *Plos Genetics*, v. 9.
- Farmer, T.; Naslavsky, N.; Caplan, S., 2018. Tying trafficking to fusion and fission at the mighty mitochondria. *Traffic*, v. 19, p. 569-577.
- Finkel, T.; Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, p. 239-247.
- Frezza, C.; Cipolat, S.; Scorrano, L., 2007. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature Protocol*, v. 2, p. 287-295.
- Hadj-Moussa, H.; Green, S.R.; Storey, K.B., 2018. The living dead: mitochondria and metabolic arrest. *IUBMB Life*.
- Hanqing, F.; Kun, S.; Mingquan, L.; Hongyu, L.; Xin, L.; Yan, L.; Yifeng, W., 2010. The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, p. 429-440.
- Hartley, J.L.; Temple, G.F.; Brasch, M.A., 2000. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Research*, v. 10, p. 1788-1795.

- Hatefi, Y., 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry*, v. 54, p.1015-1069.
- Hayasaka, K.; Numakura, C.; Toyota, K.; Kakizaki, S.; Watanabe, H.; Haga, H.; Takahashi, H.; Takahashi, Y.; Kaneko, M.; Yamakawa, M.; Nunoi, H.; Kato, T.; Ueno, Y.; Mori, M., 2014. Medium-chain triglyceride supplementation under a low-carbohydrate formula is a promising therapy for adult-onset type II citrullinemia. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, v. 1, p. 42-50.
- Hayasaka, K.; Numakura, C.; Yamakawa, M.; Mitsui, T.; Watanabe, H.; Haga, H.; Yazaki, M.; Ohira, H.; Ochiai, Y.; Tahara, T.; Nakahara, T.; Yamashiki, N.; Nakayama, T.; Kon, T.; Mitsubuchi, H.; Yoshida, H., 2018. Medium-chain triglycerides supplement therapy with a low-carbohydrate formula can supply energy and enhance ammonia detoxification in the hepatocytes of patients with adult-onset type II citrullinemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 41, p. 777-784.
- Hedden, M. P.; Buse, M. G., 1982. Effects of glucose, pyruvate, lactate, and amino acids on muscle protein synthesis. *American Journal of Physiology*, v. 242, p. E184-E192.
- Herrero-Yraola, A.; Bakhit, S.M.A.; Franke, P.; Weise, C.; Schweiger, M.; Jorcke, D.; Ziegler, M., 2001. Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. *The EMBO Journal*, v.20, p.2404-2412.
- Iwata, S.; Lee, J. W.; Okada, K.; Lee, J.K.; Iwata, M.; Rasmussen, B.; Link, T.A.; Ramaswamy, S.; Jap, B.K., 1998. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc<sub>1</sub> Complex. *Science Magazine*, v.281, p.64-71.

- Jarmuszkiewicz, W.; Sluse-Goffart, C. M.; Hryniewiecka, L.; Sluse, F.E., 1999. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 23198-23202.
- Jarmuszkiewicz, W.; Behrendt, M.; Navet, R.; Sluse, F.E., 2002. Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development. *FEBS Letters*, v. 532, p. 459-444.
- Jarmuszkiewicz, W.; Milani, G.; Fortes, F.; Schreiber, A.Z.; Sluse, F.E.; Vercesi, A.E., 2000. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Letters*, v. 467, p. 145-149.
- Jarmuszkiewicz, W.; Woyda-Ploszczyca, A.; Antos-Krzeminska, N.; Sluse, F.E., 2010. Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, v. 1797, p. 792-799.
- Kane, D. A., 2014. Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. *Frontiers in Neuroscience*, v. 8.
- Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J., 2015. The Phyre2 web portal for the protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, v. 10, p. 845-858.
- Kerscher, S.J., 2000. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, v. 1459, p. 274-283.
- Kikuchi, A.; Arai-Ichinoi, N.; Sakamoto, O.; Matsubara, Y.; Saheki, T.; Kobayashi, K.; Ohura, T.; Kure, S., 2012. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in *SLC25A13*. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 105, p. 553-558.

- Kimura, K.; Kuwayama, H.; Amagai, A.; Maeda, Y., 2010. Developmental significance of cyanide-resistant respiration under stressed conditions: experiments in *Dictyostelium* cells. *Development, Growth & Differentiation*, v. 52, p. 645-656.
- Kobayashi, K.; Sinasac, D.S.; Iijima, M.; Boright, A.P.; Begum, L.; Lee, J.R.; Yasuda, T.; Ikeda, S.; Hirano, R.; Terazono, H.; Crackower, M.A.; Kondo, I.; Tsui, L.-C.; Scherer, S.W.; Saheki, T., 1999. The gene mutated in adult-onset type II citrullinemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nature Genetics*, v. 22, p. 159-163.
- Komatsu, M.; Kimura, T.; Yazaki, M.; Tanaka, N.; Yang, Y.; Nakajima, T.; Horiuchi, A.; Fang, Z.Z.; Joshita, S.; Matsumoto, A.; Umemura, T. Tanaka, E.; Gonzalez, F.J., Ikeda, S.; Aoyama, T., 2015. Steatogenesis in adult-onset type II citrullinemia is associated with down-regulation of PPAR $\alpha$ . *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1852, p. 473-481.
- Kowaltowski, A.J.; de Souza-Pinto, N.C.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, p. 333-343.
- Krebs, H.A., 1932. The discovery of the ornithine cycle of urea synthesis. *Biochemical Education*, v. 1, p. 19-23.
- Kulawiak, B.; Höpker, J.; Gebert, M.; Guiard, B.; Wiedemann, N.; Gebert, N., 2012. The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1827, p. 612-626.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685.
- Landy, A., 1989. Dynamic, Structural, and Regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*, v. 58, p. 913-949.

- La Noue, K.F.; Williamson, J.R., 1971. Interrlation between malate-aspartate shuttle and citric acid cycle in rat heart mitochondria. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 20, p. 119-140.
- Larsen, S.B.; Hanss, Z.; Krüger, R., 2018. The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell and Tissue Research*, v. 373, p. 31-37.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M., 1993. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: *Principles of Biochemistry*. New York, Worth Publishers, Inc., p. 542-597.
- Leonard, J.V.; Morris, A.A.M., 2002. Urea cycle disorders. *Seminars in Neonatology*, v. 7, p. 27-35.
- Lin, H.; Kwan, A. L.; Dutcher, S. K., 2010. Synthesizing and Salvaging NAD<sup>+</sup>: Lessons Learned from *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLOS Genetics*, v.6, p.1-15.
- Lin, S. J.; Guarente, L., 2003. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, v.15, p.241-246.
- Lu, Y. B.; Kobayashi, K.; Ushikai, M.; Tabata, A.; Iijima, M.; Li, M. X.; Lei, L.; Kawabe, K.; Taura, S.; Yang, Y.; Liu, T-T.; Chiang, S-H.; Hsiao, K-J.; Lau, Y-L.; Tsui, L-C.; Lee, D. H.; Saheki, T., 2005. Frequency and distribution in East Asia of 12 mutations identified in the *SLC25A13* gene of Japanese patients with citrin deficiency. *Journal of Human Genetics*, v. 50, p. 338-346.
- Luévano-Martínez, L.A.; Moyano, E.; de Lacoba, M.G.; Rial, E.; Uribe-Carvajal, S., 2010. Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1797, p. 81-88.



- Macdonald, R.; Barnes, K.; Hastings, C.; Mortiboys, H., 2018. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? *Biochemical Society Transactions*, v. 46, p. 891-909.
- McDonell, M.W., Simon, M.N.; Studier, F.W., 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral alkaline gels. *Journal of Molecular Biology*, v. 110, p. 119-146.
- Magnani, T.; Soriani, F.M.; Martins, V.P.; Nascimento, A.P.; Tudella, V.G.; Curti, C.; Uyemura, S.A., 2007. Cloning and functional expression. Of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiology Letters*, v. 271, p. 230-238.
- Manjunath, N.; Wu, H.; Subramanya, S.; Shankar, P., 2009. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, p. 732-745.
- Manickam, A.H.; Michael, M.J.; Ramasamy, S., 2017. Mitochondrial genetics and therapeutic overview of Leber's hereditary optic neuropathy. *Indian Journal of Ophthalmology*, v. 65, p. 1087-1092.
- Marella, M.; Seo, B. B.; Nakamaru-Ogiso, E.; Greenamyre, J. T.; Matsuno-Yagi, A.; Yagi, T., 2008. Protection by the *NDI1* gene against neurodegeneration in a rotenone rat model of Parkinson's disease. *Plos One*.
- Marella, M.; Seo, B. B.; Yagi, T.; Matsuno-Yagi, A., 2009. Parkinson's disease and mitochondrial complex I: a perspective on the Ndi1 therapy. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 41, p. 493-497.
- Marella, M.; Seo, B. B.; Flotte, T. R.; Matsuno-Yagi, A.; Yagi, T., 2011. No immune responses by the expression of the yeast Ndi1 protein in rats. *Plos One*.
- Margulis, L. On the Origin of Mitosing Cells, 1967. *Journal of Theoretical Biology*, v. 14, p. 225-274.

- Martins, V.P.; Soriani, F.M.; Magnani, T.; Tudella, V.G.; Goldman, G.H.; Curti, C.; Uyemura, S.A., 2008. Mitochondrial function in the yeast form of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 40, p. 297-305.
- Martins, V.P.; Dinamarco, T.M.; Curti, C.; Uyemura, S.A., 2011. Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 43, p. 81-88.
- McKenna, M. C.; Hopkins, I. B.; Lindauer, S. L.; Bamford, P., 2006. Aspartate aminotransferase in synaptic and nonsynaptic mitochondria: Differential effect of compounds that influence transient hetero-enzyme complex (metabolon) formation. *Neurochemistry International* v.48, p.629-636.
- McMurray, W. C.; Mohyuddin, F.; Rossiter, R. J.; Rathbun, J. C.; Valentine, G. H.; Koegler, S. J.; Zarfes, D. E., 1962. Citrullinuria, a new aminoaciduria associated with mental retardation. *The Lancet*, v.1, pp. 138.
- Meijer, A. J.; Gimpel, J. A.; Deleeuw, G.; Tischler, M. E.; Tager, J. M.; Williamson, J. R., 1978. Interrelationships between gluconeogenesis and ureogenesis in isolated hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 253, p. 2308-2320.
- Meyer, A.; Laverny, G.; Bernardi, L.; Charles, A.L.; Alsaleh, G.; Pottecher, J.; Sibilia, J.; Geny, B., 2018. Mitochondria: an organelle of bacterial origin controlling inflammation. *Frontiers in Immunology*, v. 9.
- Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, v.191, p. 144-148.
- Miyazaki, T.; Nagasaka, H.; Komatsu, H.; Inui, A.; Morioka, I.; Tsukahara, H.; Kaji, S.; Hirayama, S.; Miida, T.; Kondou, H.; Ihara K.; Yagi, M.; Kizaki, Z.; Bessho, K.;

- Kodama, T.; Iijima, K.; Yorifuji, T.; Matsuzaki, Y.; Honda, A., 2018. Serum Amino acid profiling in citrin-deficient children exhibiting normal liver function during the apparently healthy period. *JIMD Reports*.
- Mondzaac, A.; Ehrlich, G.E.; Seegmiller, J.E., 1965. An enzymatic determination of ammonia in biological fluids. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 66, p. 526-531.
- Moore, A.L.; Siedow, J.N., 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, v. 1059, p.121-140.
- Moore, C.B.; Guthrie, E.H.; Huang, M.T.-H.; Taxman, D.J., 2010. Short Hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods in Molecular Biology*, v. 629, p. 141-158.
- Moriyama, M.; Li, M. X.; Kobayashi, K.; Sinasac, D. S.; Kannan, Y.; Iijima, M.; Horiuchi, M.; Tsui, L-C.; Tanaka, M.; Nakamura, Y.; Saheki, T., 2006. Pyruvate ameliorates the defect in ureogenesis from ammonia in citrin-deficient mice. *Journal of Hepatology*, v. 44, p. 930-938.
- Mutoh, K.; Kurokawa, K.; Kobayashi, K.; Saheki, T., 2008. Treatment of a citrin-deficient patient at the early stage of adult-onset type II citrullinemia with arginine and sodium pyruvate. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. v. 31, p. S343-S347.
- Naini, A.B.; Lu, J.; Kaufmann, P.; Bernstein, R.A.; Mancuso, M.; Bonilla, E.; Hirano, M; DiMauro, S., 2005. Novel Mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF. *JAMA Neurology*, v. 62, p. 473-476,.
- Nicholls, D.G.; Darley-USmar, V.M.; Wu, M.; Jensen, P.B.; Rogers, G.W.; Ferrick, D.A., 2010. Bioenergetic Profile Experiment using C2C12 Myoblast Cells. *Journal of Visualized Experiments*, v. 46.

- Nielsen, T.T.; Stótttrup, N.B.; Lófgren, B.; Bótker, H.E., 2011. Metabolic fingerprint of ischaemic cardioprotection: importance of the malate-aspartate shuttle. *Cardiovascular Research*, v. 91, p. 3421-3449.
- Olson, A.; Anfinsen, C.B., 1953. Kinetic and equilibrium studies on crystalline L-glutamic acid dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 202, p. 841-856.
- Onyango, P.; Celic, I.; McCaffery, J.M.; Boeke, J.D.; Feinberg, A., 2002. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.99, p.13653-13658.
- Palmieri, F.; Pierri, C.L.; De Grassi, A.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A.R., 2011. Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: review with new insights. *The Plant Journal*, v. 66, p. 161-181.
- Palmieri, F.; Pierri, C. L., 2009. Structure and function of mitochondrial carriers – role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. *FEBS Letters*, v. 584, p. 1931-1939.
- Palmieri, F.; Rieder, B.; Ventrella, A.; Blanco, E.; Do, P. T.; Nunes-Nesi, A.; Trauth, A. U.; Fiermonte, G.; Tjaden, J.; Agrimi, G.; Kirchberger, S.; Paradies, E.; Fernie, A. R.; Neuhaus, H. E., 2009. Molecular Identification and Functional Characterization of *Arabidopsis thaliana* Mitochondrial and Chloroplastic NAD<sup>+</sup> Carrier Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 31249-31259.
- Palmieri, F., 2008. Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1777; p. 564-578.
- Palmieri, L.; Pardo, B.; Lasorsa, F. M.; Arco, A. del; Kobayashi, K.; Iijima, M.; Runswick, M. J.; Walker, J. E.; Saheki, T.; Satrústegui, J.; Palmieri, F., 2001. Citrin and aralar

- are Ca<sup>2+</sup>-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *The EMBO Journal*, v. 20, p. 5060-5069.
- Panel, M.; Ghaleh, B.; Morin, D., 2018. Mitochondria and aging: a role for the mitochondrial transition pore? *Aging Cell*, v. 17, p. 1-15.
- Park, J. S.; Li, Y.; Bai, Y., 2007. Yeast NDI1 improve oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1772, p. 533-542.
- Pattnaik, B.R.; Asuma, M.P.; Spott, R.; Piller, D.-A., 2012. Genetic defects in the hotspot of inwardly rectifying K<sup>+</sup> (Kir) channels and their metabolic consequences: a review. *Molecular Genetics Metabolism*, v. 105, p. 64-72.
- Penfound, T.; Foster, J. W., 1996. NAD-Dependent DNA-Binding Activity of the Bifunctional NadR Regulator of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, v.181, p.648-655.
- Perales-Clemente, E.; Bayona-Bafaluy, M. P.; Pérez-Martos, A.; Barrientos, A.; Fernández-Silva, P.; Enriquez, J. A., 2008. Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria. *PNAS*. V. 105, p. 18735-18739.
- Petkova, I.; Mateva, L.; Beniozef, D.; Petrov, K.; Thorn, W., 2000. Sodium pyruvate infusions in patients with alcoholic liver disease. *Acta Physiologica Pharmacology*, v. 25, p. 103-108.
- Rabier, D.; Kamoun, P., 1995. Metabolism of citrulline in man. *Amino Acids*, v. 9, p. 299-316.
- Rao, D.D.; Vorhies, J.S.; Senzer, N.; Nemunaitis, J., 2009. siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, p. 746-759.

- Rasmusson, A. G.; Muller, I. M., 2006. Multiple Energy-Conservation Bypasses in Oxidative Phosphorylation of Plant Mitochondria. *Plant Physiology*.
- Ricquier, D.; Bouillaud, F., 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochemical Journal*, v. 345, p. 161-179.
- Rogozin, I.B.; Pavlov, Y.I., 2003. Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. *Mutation Research*, v. 544, p. 65-85.
- Saheki, T.; Iijina, M.; Li, M.X.; Kobayashi, K.; Horiuchi, M.; Ushikai, M.; Okumura, F.; Meng, X.J.; Inoue, I.; Tajima, A.; Moriyama, M.; Eto, K.; Kadowaki, T.; Sinasac, D.S.; Tsui, L-C.; Tsuji, M.; Kobayashi, T., 2007. Citrin/Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double knock-out mice recapitulate features of human citrin deficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 25041-25052.
- Saheki, T.; Inoue, K.; Ono, H.; Tushima, a.; Katsura, N.; Yokogawa, M.; Yoshidumi, Y.; Kuhara, T.; Ohse, M.; Eto, K.; Kadowaki, T.; Sinasac, D. S.; Kobayashi, K., 2011. Metabolomic analysis reveals hepatic metabolite perturbations in citrin/mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mice, a model of human citrin deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 104, p. 492-500.
- Saheki, T.; Inoue, K.; Tushima, A.; Mutoh, K.; Kobayashi, K., 2010. Citrin deficiency and current treatment concepts. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 100, p. S59-S64.
- Saheki, T.; Kobayashi, K.; Terashi, M.; Ohura, T.; Yanagawa, Y.; Okano, Y.; Hattori, T.; Fujimoto, H.; Mutoh, K.; Kizaki, Z.; Inui, A., 2008. Reduced carbohydrate intake in citrin-deficient subjects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, v. 31, p. 386-394.
- Saheki, T.; Iijina, M.; Li, M.X.; Kobayashi, K.; Horiuchi, M.; Ushikai, M.; Okumura, F.; Meng, X.J.; Inoue, I.; Tajima, A.; Moriyama, M.; Eto, K.; Kadowaki, T.; Sinasac, D.S.; Tsui, L-C.; Tsuji, M.; Kobayashi, T., 2007. Citrin/Mitochondrial glycerol-3-phosphate

dehydrogenase double knock-out mice recapitulate features of human citrin deficiency. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 25041-25052.

Saheki, T.; Kobayashi, K., 2002. Mitochondrial aspartate glutamate carrier (citrin) deficiency as the cause of adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and idiopathic neonatal hepatitis (NICCD). *Journal of Human Genetics*, v. 33, p. 333-341.

Saheki, T.; Kobayashi, K.; Iijima, M.; Horiuchi, M.; Begum, L.; Jalil, M.A.; Li, M.X.; Lu, Y.B.; Ushikai, M.; Tabata, A.; Moriyama, M.; Hsiao, K-J.; Yang, Y., 2004. Adult-onset type II citrullinemia and idiopathic neonatal hepatitis caused by citrin deficiency: involvement of the aspartate glutamate carrier for urea synthesis and maintenance of the urea cycle. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 81, p. S20-S26.

Saheki, T.; Kobayashi, K.; Iijima, M.; Nishi, I.; Yasuda, T.; Yamaguchi, N.; Gao, H. Z.; Jalil, M. A.; Begum, L.; Li, M. X., 2002. Pathogenesis and pathophysiology of citrin (a mitochondrial aspartate glutamate carrier) deficiency. *Metabolic Brain Diseases*, v. 17, p. 335-346.

Saheki, T.; Song, Y.Z., 2005. Citrin Deficiency. In Adam, M.P.; Ardinger, H.H.; Pagon, R.A.; Wallace, S.E.; Bean, L.J.H.; Stephens, K.; Amemiya, A., editors. *GeneReviews*, Seattle (WA): University of Washington.

Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v.230, p.1350-1354.

Sakamuri, S.S.V.P.; Sperling, J.A.; Sure, V.N.; Dholakia, M.H.; Peterson, N.R.; Rutkai, I.; Mahalingam, P.S.; Satou, R.; Katakam, P.V.G., 2018. Measurement of respiratory function in isolated cardiac mitochondria using SeaHorse XFe24 Analyzer: applications for aging research. *GeroScience*, v. 40, p. 347-356.

- Sambrook, J.; Green, M.R., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chains-terminating inhibitors. *PNAS*, v. 74, p. 5463-5467.
- Savory, J.; Kaplan, A., 1966. A gas chromatographic method for the determination of lactic acid in blood. *Clinical Chemistry*, v. 12, p. 559-569.
- Schon, E. A.; DiMauro, S.; Hirano, M.; Gilkerson, R.W., 2010. Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends Molecular Medicine*, v. 16, p.268-276.
- Semighini, C.P.; Marins, M.; Goldman, M.H.S.; Goldman, G.H., 2002. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter *Atr* genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. *Applied Environmental Microbiology*, v. 68, p. 1351-1357.
- Seo, B. B.; Nakamaru-Ogiso, E.; Flotte, T. R.; Matsuno-Yagi, A.; Yagi, T., 2006. *In vivo* complementation of complex I by the yeast *Ndi1* enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 14250-14255.
- Silzer, T.K.; Phillips, N.R., 2018. Etiology of type 2 diabetes and Alzheimer's disease: Exploring the mitochondria. *Mitochondrion*.
- Sinasac, D.S.; Moriyama, M.; Jalil, M.A.; Begum, L.; Li, M.X.; Iijima, M.; Horiuchi, M.; Robinson, B.H.; Kobayashi, K.; Saheki, T.; Tsui, L-C., 2004. *Slc25a13*-knockout mice harbor metabolic deficits but fail to display hallmark of adult-onset type II citrullinemia. *Molecular and Cellular Biology*, v. 24, p. 527-536.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochemistry*, v. 150, p. 76-85.



- Song, Y.-Z.; Deng, M.; Chen, F.-P.; Wen, F.; Guo, L.; Cao, S.-L.; Gong, J.; Xu, H.; Jiang, G.Y.; Zhong, L.; Kobayashi, K.; Saheki, T.; Wang, Z.-N., 2011. Genotypic and phenotypic features of citrin deficiency: five-year experience in a Chinese pediatric center. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 28, p. 33-40.
- Srivastava, S., 2016. Emerging therapeutic roles for NAD<sup>+</sup> metabolism in mitochondrial and age-related disorders. *Clinical and Translational Medicine*, v. 5.
- Stumvoll, M.; Meyer, C.; Mitrakou, A.; Gerich, J.E., 1999. Important role of the kidney in human carbohydrate metabolism. *Medical Hypotheses*, v. 52, p. 363-366.
- Summar M., 2001. Current strategies for the management of neonatal urea cycle disorders. *Journal of Pediatrics*, v. 138, p.S30–39.
- Tamamori, A.; Okano, Y.; Ozaki, H.; Fujimoto, A.; Kajiwara, M.; Fukusa, K.; Kobayashi, K.; Saheki, T.; Tagami, Y.; Yamano, T., 2002. Neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency: severe hepatic dysfunction in an infant requiring liver transplantation. *European Journal of Pediatrics*, v. 161, p. 609-613.
- TeSlaa, T.; Teitell, M.A., 2014. Techniques to Monitor Glycolysis. *Methods Enzymology*, v. 542, p. 91-114.
- Thomas, P.; Smart, T.G., 2005. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 51, p. 187-200.
- Thorbun, D.R., 2004. Mitochondrial diseases: not so rare after all. *Internal Medicine Journal*, v.34, p.3-5.
- Todisco, S.; Agrimi, G.; Castegna, A.; Palmieri, F., 2006. Identification of the mitochondrial NAD<sup>+</sup> transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 1524-1531.

- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, T., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 76, p. 4350-4354.
- Tudella, V.G.; Curti, C.; Soriani, F.M.; Santos, A.C.; Uyemura, S.A., 2004. In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, p. 162-172.
- Uyemura, S.A.; Luo, S.; Moreno, S.N.J.; Docampo, R., 1999. Oxidative phosphorylation, Ca<sup>2+</sup> transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 9709-9715.
- VanLinden, M. R.; Dölle, C.; Pettersen, I. K. N.; Kulikova, V. A.; Niere, M.; Agrimi, G.; Dyrstad, S. E.; Palmieri, F.; Nikiforov, A. A.; Tronstad, K. J.; Ziegler, M., 2015. Subcellular distribution of NAD<sup>+</sup> between cytosol and mitochondria determines the metabolic profile of human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 290, p. 27644-27659.
- Vercesi, A.E.; Kowaltowski, A.J.; Grijalba, M.T.; Meinicke, A.R.; Castilho, R.F., 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Bioscience Reports*, v. 17.
- Vercesi, A.E.; Castilho, R.F.; Kowaltowski, A.J.; de Oliveira, H.C.F.; de Souza-Pinto, N.C.; Figueira, T.R.; Busanello, E.N.B., 2018. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 129, p. 1-24.
- Wakino, S.; Hasegawa, K.; Itoh, H., 2015. Sirtuin and metabolic kidney disease. *Kidney International*, v. 88, p. 691-698.

- Wallace, D.C., 1999. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science*, v. 283, p.1482-1488.
- Wallace, D.C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics*, v. 39, p. 359-407.
- Watford, M., 2003. The urea cycle. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 31, p. 289-297.
- Westgard, J.O.; Lahmeyer, B.L.; Birnbaum, M.L., 1972. Use of the Du Pont "Automatic Clinical Analyzer" in Direct Determination of Lactic Acid in Plasma Stabilized with Sodium Fluoride. *Clinical Chemistry*, v. 18, p. 1334-1338.
- Williamson, J. R., 1976. Role of anion transport in the regulation of metabolism. In: Hanson, R. W. and Mehlman, M. A. (eds.), *Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species*, Wiley, New York, p. 165-238.
- Wohlrab, H., 2005. The human mitochondrial transport protein family: identification and protein regions significant for transport function and substrate specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1709, p. 157-168.
- Woo, H.I.; Park, H.-D.; Lee, Y.-W., 2014. Molecular genetics of citrullinemia type I and II. *Clinica Chimica Acta*, v. 431, p. 1-8.
- Wu, M.; Neilson, A.; Swift, A. L.; Moran, R.; Tamagnine, J.; Parslow, D.; Armistead, S.; Lemire, K.; Orrell, J.; Teich, J.; Chomicz, S.; Ferrick, D. A., 2007. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *American Journal of Physiology*, v. 292, p. C125-C136.

- Yagi, T.; Seo, B. B.; Nakamaru-Ogiso, E.; Marella, M.; Barber-Singh, J.; Yamashita, T.; Matsuno-Yagi, A., 2006. Possibility of transkingdom gene therapy for Complex I diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1757, p. 708-714.
- Yagi, T.; Seo, B. B.; Nakamaru-Ogiso, E.; Marella, M.; Barber-Singh, J.; Yamashita, T.; Kao, M. C.; Matsuno-Yagi, A., 2006. Can a single subunit yeast NADH dehydrogenase (Ndi1) remedy diseases caused by respiratory complex I defects? *Rejuvenation Research*, v. 9, p. 191-197.
- Yang, S.J.; Huh, J.W.; Lee, J.E.; Choi, S.Y.; Kim, T.U.; Cho, S.W., 2003. Inactivation of human glutamate dehydrogenase by aluminum. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, p.2538-2546.
- Yasuda, T.; Yamaguchi, N.; Kobayashi, K.; Nishi, I.; Horinouchi, H.; Jalil, M.A.; Li, M.X.; Ushikai, M.; Iijima, M.; Kondo, I.; Saheki, T., 2000. Identification of two novel mutations in the SLC25A13 gene and detection of seven mutations in 102 patients with adult-onset type II citrullinemia. *Human Genetics*, v. 107, p. 537-545.
- Ying, W., 2008. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 10, p. 179-198.
- Yun, J.; Finkel, T., 2014. Mitohormesis. *Cell Metabolism*, v. 19, p. 757-766.
- Zeidler, J.D.; Fernandes-Siqueira, L.O.; Carvalho, A.S.; Cararo-Lopes, E.; Dias, M.H.S.; Ketzer, L.A.; Galina, A.; Poian, A.T., 2017. Short-term starvation is a strategy to unravel the cellular capacity of oxidizing specific exogenous/endogenous substrates in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, p. 14176-14187.
- Zhou, W.; Ramachandran, D.; Mansouri, A.; Dailey, M.J., 2017. Glucose stimulates intestinal epithelial crypt proliferation by modulating cellular energy metabolism. *Cellular Physiology*, p. 1-11.