

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

RAFAELA BICEGO

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE INIBIDORES QUÍMICOS DA NAD(P)+ TRANSIDROGENASE MITOCONDRIAL

FUNCTIONAL EVALUATION OF CHEMICAL INHIBITORS OF THE MITOCHONDRIAL NAD(P)+ TRANSHYDROGENASE

> CAMPINAS 2021

RAFAELA BICEGO

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE INIBIDORES QUÍMICOS DA NAD(P)⁺ TRANSIDROGENASE MITOCONDRIAL

FUNCTIONAL EVALUATION OF CHEMICAL INHIBITORS OF THE MITOCHONDRIAL NAD(P)⁺ TRANSHYDROGENASE

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

Dissertation presented to the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas as part of the requisites required to obtain a Master in Sciences.

ORIENTADOR: PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO COORIENTADORA: DRA. ANNELISE FRANCISCO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA RAFAELA BICEGO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Bicego, Rafaela, 1995-Avaliação funcional dos inibidores químicos da NAD(P)+ transidrogenase mitocondrial / Rafaela Bicego. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.
Orientador: Roger Frigério Castilho. Coorientador: Annelise Francisco. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
1. Camundongo C57BL/6J. 2. Estresse oxidativo. 3. Mitocôndria. 4. NADP trans-hidrogenases. I. Castilho, Roger Frigério, 1972-. II. Francisco, Annelise, 1989-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências

Informações para Biblioteca Digital

Médicas, IV. Título.

Título em outro idioma: Functional evaluation of chemical inhibitors of the mitochondrial NAD(P)+ transhydrogenase Palavras-chave em inglês: C57BL/6J Oxidative stress Mitochondria NADP transhydrogenases Área de concentração: Fisiopatologia Médica Titulação: Mestra em Ciências Banca examinadora: Roger Frigério Castilho [Orientador] Moacir Wajner Fabio Rogério Data de defesa: 21-05-2021 Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0003-3511-9821

- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/8897321518724085

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

RAFAELA BICEGO

ORIENTADOR: PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO

COORIENTADORA: DRA. ANNELISE FRANCISCO

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. ROGER FRIGÉRIO CASTILHO
- 2. PROF. DR. MOACIR WAJNER
- 3. PROF. DR. FABIO ROGÉRIO

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 21/05/2021

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem ele nada disso teria ocorrido.

A minha família, em especial ao Gustavo Rodrigues de Oliveira pela paciência e incentivo durante a produção acadêmica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roger Frigério Castilho e coorientadora Dra. Annelise Francisco, pela oportunidade, amizade e aprendizado. Eles foram muito importantes para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao grupo de pesquisa, em especial à Edilene de Souza Siqueira Santos, pelo suporte, apoio e amizade durante esta etapa.

Ao grupo do Laboratório de Fisiologia Clínica do HC da Unicamp, em especial à Laurione Candido de Oliveira, pelo incentivo pela busca de conhecimento.

Enfim, a todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta dissertação.

RESUMO

A NAD(P)⁺ transidrogenase mitocondrial, também conhecida como transidrogenase de nucleotídeos de nicotinamida (NNT), é uma proteína integral da membrana mitocondrial interna e catalisa uma reação reversível que consiste na transferência de um hidreto entre NAD(H) e NADP(H) acoplada ao transporte de um próton entre o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial. Em condições fisiológicas, a reação da NNT ocorre predominantemente no sentido da redução de NADP⁺ (i.e., reação direta), fazendo com que essa enzima seja uma importante fonte mitocondrial de NADPH, o qual é utilizado por sistemas antioxidantes da organela e em vias de biossíntese. A supressão da atividade da NNT tem relevância não só como abordagem experimental para avaliação da contribuição desta enzima em diferentes contextos fisiológicos e patológicos, como também consiste em uma possível abordagem terapêutica em condições patológicas específicas. A inibição da atividade NNT pode ser obtida por modificações moleculares como silenciamento de sua expressão, mutações ou com o uso de inibidores químicos. O presente trabalho objetivou avaliar a eficácia de alguns dos principais compostos propostos como inibidores químicos da NNT, diante de possíveis efeitos inespecíficos destes sobre a respiração mitocondrial. Foram avaliados os compostos: 4-cloro-7-nitrobenzofuran (NBD-CI), N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), palmitoil-CoA, palmitoil-L-carnitina e rhein. Diferentes concentrações desses compostos foram testadas em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo quanto a (1) capacidade de inibir as reações direta e reversa da NNT em meio contendo detergente, e (2) efeitos sobre a função respiratória de mitocôndrias intactas, estimada pelo consumo de oxigênio estimulado por ADP e pelo estado respiratório não-fosforilante após adição de oligomicina. De forma geral, concentrações destes compostos capazes de gerar uma inibição parcial das reações direta e reversa da NNT em mitocôndrias, ocasionaram um prejuízo significativo na função respiratória mitocondrial. Dentre os compostos testados, o NBD-Cl mostrou uma melhor relação entre a inibição das reações da NNT e menor impacto sobre a função respiratória mitocondrial. Tendo em vista esse resultado, foram realizados testes adicionais com NBD-CI em cultura primária de astrócitos sem NNT funcional, onde foi feita a contagem de células viáveis, medida da metabolização de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium) e dosagem de

ATP após 48 h de exposição dessa cultura a diferentes concentrações de NDB-CI. Nesses experimentos, as concentrações de NBD-CI que causaram somente uma inibição parcial das reações direta e reversa da NNT (i.e., 10 e 20 μM) diminuíram significativamente a proliferação e viabilidade de astrócitos, demonstrando haver um efeito tóxico do NBD-CI. Em outro conjunto de experimentos, observou-se que o NBD-CI inibiu parcialmente a capacidade de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos com NNT intacta metabolizarem o peroxido orgânico *tert*-butil hidroperóxido, o que pode ser devido a inibição da NNT, mas também devido a efeitos tóxicos e inibitórios sobre outras proteínas mitocondriais. Os dados aqui apresentados permitem concluir que, embora os compostos testados realmente tenham apresentado efeitos inibitórios sobre as reações direta e reversa da NNT, concentrações efetivas desses compostos causam efeitos indesejáveis significativos sobre a função respiratória mitocondrial e viabilidade celular.

Palavras-chave: camundongo C57BL/6; desequilíbrio redox; mitocôndria; transidrogenase de nucleotídeos de nicotinamida.

ABSTRACT

The mitochondrial NAD(P)⁺ transhydrogenase, also known as nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT), is an integral protein of the inner mitochondrial membrane that catalyzes a reversible transfer of a hydride between NAD(H) and NADP(H) coupled to the transport of a proton between the intermembrane space and mitochondrial matrix. In most physiological conditions, the NNT reaction occurs towards NADP⁺ reduction (i.e., forward reaction); because of that this enzyme is an important mitochondrial source of NADPH, which is used by antioxidant systems in the organelle and in biosynthetic pathways. The suppression of NNT activity is relevant not only as an experimental approach to assess the contribution of this enzyme in different physiological and pathological contexts, but also consists of a possible therapeutic approach in specific pathological conditions. The inhibition of NNT activity can be achieved by molecular modifications such as silencing its expression, mutations or with the use of chemical inhibitors. The present study aimed at evaluating the efficacy of the main chemical compounds proposed as NNT inhibitors in view of their possible effects on other mitochondrial components. The compounds 4-chloro-7nitrobenzofuran (NBD-CI), N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), palmitoyl-CoA, palmitoyl-L-carnitine and rhein were evaluated. Different concentrations of these compounds were tested in isolated mitochondria from mouse liver regarding (1) the ability to inhibit the direct and reverse reactions of NNT in detergent-solubilized mitochondria, and (2) effects on respiratory function of intact mitochondria, estimated by ADP-stimulated oxygen consumption and non-phosphorylating respiratory state due to oligomycin addition. In general, concentrations of these compounds capable of generating a partial inhibition of the direct and reverse activities of NNT in mitochondria, significantly impaired mitochondrial respiratory function. Among the compounds assayed, NBD-CI showed a better relationship between NNT reaction inhibition and lower impact on mitochondrial oxygen consumption. In view of this result, additional experiments were carried out with NBD-CI in a primary culture of astrocytes devoid of functional NNT, where it was evaluated cell number, metabolism of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and ATP content after 48 h of exposure to different NDB-CI concentrations. In these experiments, NBD-CI concentrations able to partially inhibit the direct and reverse NNT reactions (i.e., 10 and 20 μ M) significantly decreased the proliferation and viability of astrocytes, demonstrating that there is a toxic effect of NBD-CI. In another set of experiments, NBD-CI partially decreased the ability of isolated mouse liver mitochondria with intact NNT to metabolize the organic peroxide *tert*-butyl hydroperoxide, which might be explained by inhibition of NNT, but also can be due to toxicity and inhibitory effects on other mitochondrial proteins. The data presented here allow us to conclude that, although the tested compounds indeed presented inhibitory effects on the direct and reverse activities of NNT, at effective concentrations they caused significant undesirable effects on mitochondrial respiratory function and cell viability.

Keywords: C57BL/6; redox imbalance; mitochondria; nicotinamide nucleotide transhydrogenase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCC	N,N'-dicyclo-hexilcarbodiimida
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
GDH	Glutamato desidrogenase (proteína)
GLUD	Glutamato desidrogenase (gene)
GPX	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa dissulfeto
IDH1	Isocitrato desidrogenase citosólica dependente de NADP
IDH2	Isocitrato desidrogenase mitocondrial dependente de NADP
IDH3	Isocitrato desidrogenase mitocondrial dependente de NAD
ME1	Enzima málica citosólica dependente de NADP
ME2	Enzima málica mitocondrial dependente de NAD ou NADP
ME3	Enzima málica mitocondrial dependente de NADP
MEs	Enzimas málicas dependentes de NADP
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)
NBD-CI	4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole
Nnt	Gene da transidrogenase de nucleotídeos de nicotinamida
NNT	Transidrogenase de nucleotídeos de nicotinamida ou NAD(P)+
	transidrogenase (proteína)
PRX	Peroxirredoxina

SOD2	Superóxido dismutase mitocondrial

t-BOOH tert-butil hidroperóxido

TR Tiorredoxina redutase

- TRX Tiorredoxina
- Δp Força prótonmotriz

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
1.1 Estrutura e função da NNT13
1. 2 Fontes produtoras de NADPH mitocondrial17
1.3 Estresse oxidativo e estado redox de NADP18
1.4 Inibidores químicos da NNT 21
2. OBJETIVOS
3. MATERIAL E MÉTODOS
4. RESULTADOS
4.1. Capítulo I - "Undesirable effects of chemical inhibitors of NAD(P) ⁺ transhydrogenase on mitochondrial respiratory function"27
4.2. Capítulo II - Avaliação da capacidade mitocondrial de metabolização de t-BOOH na presença de NBD-CI41
5. DISCUSSÃO
6. CONCLUSÕES
7. REFERÊNCIAS
8. ANEXOS
8.1. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP)
8.2. Autorização de copyright60

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura e função da NNT

A NADP⁺ transidrogenase mitocondrial, também conhecida como transidrogenase de nucleotídeos de nicotinamida (NNT) foi descoberta em extratos de bactérias *Pseudomonas fluorescens* por Colowick e colaboradores em 1952 (1). Nesse estudo, observou-se a redução de NADP⁺ associada à oxidação de NADH, o que foi atribuída a uma reação catalítica realizada por uma enzima, posteriormente denominada NNT. Em estudos posteriores, a NNT foi detectada também em outras bactérias como *Pseudomonas aeruginosa, Azotobacter vinelandii, Azotobacter chroococcurn* e *Azotobacter agile*, em uma forma solúvel e também em tecidos de mamíferos, sendo nesse caso detectada em uma forma insolúvel (2). Especificamente em mamíferos, a NNT foi primeiramente relatada em preparações de músculo cardíaco bovino (3), pouco tempo depois também foi detectada em outros tecidos, como fígado (4). Essas primeiras descrições da NNT em mamíferos também apontaram que a NNT estava fortemente ligada à membrana mitocondrial interna (2,4).

Atualmente, sabe-se que a NNT é uma proteína transmembrana, localizada na membrana mitocondrial interna. Funcionalmente, essa proteína realiza uma reação reversível, caracterizada pela transferência de um hidreto (H⁻) entre NAD e NADP acoplada ao transporte de um próton (H⁺) entre o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial, estando, portanto, acoplada à força prótonmotriz (Δ p) proveniente do potencial eletroquímico de H⁺ transmembrana (5). Em resumo, a NNT catalisa a seguinte reação:

 $NADH + NADP^+ + H_{out}^+ \rightleftharpoons NAD^+ + NADPH + H_{in}^+$

Sendo assim, o sentido da ocorrência de tal reação é controlado pelas razões de NAD⁺/NADH e NADP⁺/NADPH na matriz mitocondrial e pelo Δp da membrana mitocondrial interna (6,7). Sob condições não energizadas, a constante de equilíbrio de tal reação é aproximadamente 1. Contudo, esse equilíbrio se desloca no sentido da redução de NADP⁺ (i.e., reação direta) na maioria das condições fisiológicas, quando o Δp da membrana mitocondrial interna está elevado e há

disponibilidade de NADH. A reação direta da NNT consiste em uma importante fonte de NADPH para vias de biossíntese, como a esteroidogênese (8,9), síntese de timidilato (10) e de alguns neurotransmissores (11), e também vias de detoxificação de peróxidos (5,12–15), como será discutido posteriormente. Em condições de queda de potencial eletroquímico de H⁺ e diminuição da razão NADH/NAD⁺, a reação da NNT pode ocorrer no sentido reverso, com redução de NAD⁺ às custas de NADPH (6). A reação reversa é relevante tanto em condições fisiológicas, como na modulação da taxa metabólica em função das concentrações de glicose em células β -pancreáticas (6,16), quanto em condições patológicas como na lesão cardíaca por sobrecarga ventricular (17,18).

Estruturalmente, a NNT de mamíferos é um homodímero simétrico constituído por dois monômeros (6), onde cada monômero dessa estrutura é composto pelos domínios I, II e III (**Figura 1**). O domínio I é caracterizado por conter o sítio de ligação de NAD e situa-se na região N-terminal da proteína. O domínio II encontra-se localizado na região central da proteína e constitui um canal de prótons, sendo também responsável pela ancoragem da proteína na membrana mitocondrial interna por possuir características hidrofóbicas. O domínio III se encontra localizado na região C-terminal da proteína e contém o sítio de ligação de NADP. Ambos os domínios I e III possuem características hidrofílicas e situam-se voltados para a matriz mitocondrial (7,19,20).



Figura 1. Modelo tridimensional de um homodímero de transidrogenase de nucleotídeos de nicotinamida (NNT). Nessa representação, em cada um dos monômeros de NNT (A e B), estão coloridos os sítios de ligação de NAD (em azul) no domínio I (em amarelo) e de NADP (em magenta) no domínio III (em verde), além do domínio II (em cinza) que se encontra inserido na membrana mitocondrial interna. Esse modelo estrutural da NNT foi baseado na enzima presente na bactéria *Thermus thermophilus.* (Modelo adaptado de Metherell e colaboradores (19)).

Recentemente, uma série de estudos buscou demonstrar como a atividade catalítica promovida pela NNT se relaciona a sua estrutura (7,19,20), utilizando-se principalmente da técnica de criomicroscopia eletrônica. Tais trabalhos revelaram que tanto a reação direta da NNT quanto a reversa dependem de uma movimentação precisa da estrutura proteica da NNT, na qual os domínios I e II permanecem imóveis enquanto o domínio III gira, permitindo não só a aproximação dos sítios de ligação de NAD e NADP, que propicia a transferência de hidretos entre esses nucleotídeos, mas

também o transporte de um próton pelo domínio II. A reação catalítica direta da NNT foi explicada por Leung et al. (20) na NNT de *T. thermophilus* e por Kampjut e Sazanov (7) na NNT de mamíferos da seguinte forma:

- Primeiramente o domínio III movimenta-se e gera uma aproximação entre o seu sítio de ligação de NADP⁺ e o sítio de ligação de NADH presente no domínio I, permitindo a transferência de um hidreto entre esses nucleotídeos.
- No segundo passo, após a transferência de hidreto entre os nucleotídeos, o domínio III se movimenta novamente e se liga ao domínio II gerando a abertura do canal de prótons contido no domínio II para o lado do espaço intramembranar. Este canal de prótons possui um resíduo de histidina (H664), que devido a sua localização é facilmente protonado (H664⁺) ao entrar em contato com o pH do espaço intermembranar. De fato, o resíduo H664 possui grande susceptibilidade a protonar-se e desprotonar-se após contato com mudanças de pH provindas da relação deste com os ambientes do espaço intermembranar e da matriz mitocondrial, de acordo com a movimentação do domínio III.
- No terceiro passo, ocorre a substituição do NADPH ligado ao domínio III por NADP⁺. Esse é um ponto chave para o prosseguimento do mecanismo catalítico, já que se não houver a troca dos nucleotídeos do domínio III a reação não continua.
- Após a ligação deste novo nucleotídeo, o domínio III se movimenta novamente e se aproxima do domínio I, no quarto e último passo desse mecanismo catalítico. Essa movimentação fará com que o canal de prótons se abra desta vez voltado à matriz mitocondrial, que por possuir um pH mais elevado ocasionará a desprotonação do resíduo H664, havendo a liberação de H⁺ para a matriz mitocondrial.

O mecanismo catalítico da reação reversa se diferencia da reação direta descrita anteriormente, por dois fatores: (1) primeiramente há a transferência de H⁻ entre NADPH e NAD⁺ e (2) depois ocorre a protonação do H664 pelo contato deste com a matriz mitocondrial, com posterior desprotonação deste após o contato com o espaço intermembranar.

1.2 Fontes produtoras de NADPH mitocondrial

O poder redutor fornecido pelo NADPH presente na matriz mitocondrial é essencial para a manutenção de vias de biossíntese e sistemas enzimáticos envolvidos na redução de tióis e detoxificação de peróxidos (12,21). Conforme exposto anteriormente, a NNT atua como uma importante fonte de NADPH mitocondrial pela sua reação direta. Estudos com mitocôndrias não energizadas em solução contendo detergente demonstraram que a NNT corresponde a 36 e 26% da atividade de fontes de NADPH em mitocôndrias de fígado e cérebro, respectivamente (14,22). Apesar disso, em mitocôndrias funcionais observou-se que a NNT pode contribuir de 0 a 100% da produção de NADPH mitocondrial, dependendo do estado metabólico mitocondrial e disponibilidade de substratos (14).

Além da NNT, algumas enzimas solúveis presentes na matriz mitocondrial são fontes relevantes de NADPH e contribuem para a manutenção de uma alta razão NADPH/NADP⁺ nesse compartimento (12,21,23,24). Dentre essas fontes simultâneas de NADPH, destacam-se a isocitrato desidrogenase dependente de NADP (IDH2), enzimas málicas dependentes de NADP (MEs) e glutamato desidrogenase (GDH), as quais realizam a redução do NADP⁺ acoplada ao fluxo de substratos metabólicos como será detalhado a seguir.

As isocitrato desidrogenases (IDH) realizam a conversão reversível de isocitrato em alfa-cetoglutarato com uso de NAD ou NADP como cofator. Em mamíferos, três isoformas desta enzima são observadas. A IDH1 e IDH2 fazem uso de NADP como cofator, no entanto diferem pela sua localização, sendo a IDH1 localizada no citosol, enquanto a IDH2 na mitocôndria. A isoforma IDH3 também está localizada na mitocôndria, porém utiliza NAD como cofator (25,26). Em mitocôndrias isoladas não energizadas, a IDH2 representa 39% da atividade de fontes de NADPH mitocondriais no fígado, e 36% no cérebro (14,22). Assim, a IDH2 é uma fonte de NADPH mitocondrial ao realizar a seguinte reação reversível:

isocitrato + NADP⁺ \rightleftharpoons α cetoglutarato + CO₂ + NADPH

As enzimas málicas catalisam a descarboxilação oxidativa do L-malato gerando como produto desta reação piruvato e CO₂. Durante essa reação, as enzimas málicas requerem um íon divalente, Mg²⁺ ou Mn²⁺, e também NAD⁺ e/ou NADP⁺ como

cofator, gerando assim NADH ou NADPH. Foram descritas em mamíferos 3 isoformas desta enzima. As ME1 e ME3 são dependentes de NADP, sendo uma citosólica e outra mitocondrial, respectivamente. Já a ME2 é uma isoforma mitocondrial que pode se utilizar de NAD ou NADP como cofator, tendo predileção por NAD. Em mitocôndrias isoladas não energizadas, as MEs representam 11% da atividade de fontes de NADPH mitocondriais no fígado, e 29% no cérebro (14,22). Em suma, as MEs catalisam a seguinte reação reversível:

malato + NADP⁺
$$\rightleftharpoons$$
 piruvato + CO₂ + NADPH

As glutamato desidrogenases catalisam a desaminação do glutamato em α -cetoglutarato, gerando também NH₃, com utilização NAD⁺ e/ou NADP⁺ como cofatores. Enquanto humanos expressam duas isoformas distintas de GDH, codificadas pelos genes *GLUD1* e *GLUD2*, a maioria dos outros mamíferos expressa somente a *GDH1*, que é específica para NADP⁺ (27–29). Essas isoenzimas estão envolvidas no catabolismo de glutamato e modulação das concentrações de amônia, e estão envolvidas no processo de secreção de insulina (30,31). Em mitocôndrias isoladas não energizadas, a GDH representa 13% da atividade de fontes de NADPH mitocondriais no fígado, e 8% no cérebro (14,22). Assim, a GDH reduz o NADP ao catalisar a seguinte reação reversível:

$$L - glutamato + H_2O + NADP^+ \rightleftharpoons \alpha cetoglutarato + NH_4 + NADPH$$

1.3 Estresse oxidativo e estado redox de NADP

Superóxido (O_2^{-}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são gerados endogenamente na mitocôndria em sítios como a cadeia transportadora de elétrons e em algumas desidrogenases mitocondriais, como a piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase (32). O O_2^{-} e o H_2O_2 podem reagir com outras moléculas dando origem a espécies mais reativas, como por exemplo o radical hidroxila (HO[•]) e o ânion peroxinitrito (ONOO⁻). Essas espécies, e outras que se originam a partir destas, são denominadas coletivamente de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estão envolvidas em uma grande variedade de vias de sinalização, mas também podem reagir com componentes celulares e causar dano a células e tecidos (33).

Contudo, as mitocôndrias também possuem uma elevada capacidade antioxidante, de forma que estas organelas agem não só como uma fonte de EROs como também como o principal local de detoxificação dessas espécies (34–36).

O equilíbrio entre a geração e eliminação de EROs garante que ocorra a sinalização redox, manutenção de integridade estrutural dos componentes celulares e enovelação correta de proteínas. O desequilíbrio entre geração e eliminação de EROs, resultando em uma maior liberação desses oxidantes, é denominado estresse oxidativo e ocasiona danos ao DNA, RNA, membranas e proteínas, além de romper a sinalização redox fisiológica (34,37). O estresse oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento e progressão de uma série de desordens que comprometem a saúde humana, tais como processos inflamatórios, intoxicações, neoplasias, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (34,36,37).

O O₂⁻⁻ gerado na mitocôndria é inicialmente removido cataliticamente pela enzima superóxido dismutase mitocondrial (SOD2), o que resulta na geração de H₂O₂. (38,39). O H₂O₂ resultante da atividade da SOD2, assim como o H₂O₂ gerado diretamente em alguns sítios da mitocôndria, pode ser decomposto a H2O pela catalase ou metabolizado pelos sistemas de detoxificação de peróxidos mitocondriais peroxidase/glutationa redutase (GR/GPX) tiorredoxina glutationa е redutase/peroxirredoxina (TR/PRX). A detoxificação do H2O2 pela catalase é independente de NADPH, porém essa enzima não é capaz de utilizar hidroperóxidos orgânicos como substratos. A catalase é observada em mitocôndrias de coração e fígado (40-42), enquanto está presente em níveis baixos ou indetectáveis em mitocôndrias de outros tecidos (43,44). Dessa forma, os sistemas GR/GPX e TR/PRX são os principais responsáveis pela detoxificação de peróxidos na matriz mitocondrial.

Nesse contexto, o NADPH atua como uma importante fonte de poder antioxidante ao sustentar a metabolização de H₂O₂ e hidroperóxidos orgânicos (R-OOH) pelos sistemas GR/GPX e TR/PRX (6,45) (**Figura 2**). A GPX reduz H₂O₂ a H₂O utilizando-se da glutationa (GSH) como doadora de elétrons, gerando a glutationa dissulfeto (GSSG). A GSSG por sua vez, será reduzida pela GR, que utiliza o NADPH como fonte de elétrons. O sistema TR/PRX atua de maneira similar; para reduzir o H₂O₂ a PRX oxida a tiorredoxina, que por sua vez é regenerada pela TR em uma reação que depende dos elétrons provindos do NADPH (46,47). O NADP⁺ gerado por essas duas vias de detoxificação poderá então ser reduzido na mitocôndria pela atividade da NNT e de outras fontes de NADPH já citadas (33–36).



Figura 2. Metabolização de peróxidos pelos sistemas GR/GPX e TRX/PRX. H_2O_2 ou R-OOH são metabolizados pelos sistemas antioxidantes dependentes de NADPH, de forma a gerar H_2O ou álcoois (R-OH), respectivamente. Nesse processo, o NADPH gerado pela NNT, IDH2, MEs e GDH fornece poder redutor para a redução da tiorredoxina oxidada (TRX_{ox}) e do GSSG.

Diversos estudos mostraram que a inibição ou ausência de NNT funcional desencadeia distúrbio redox mitocondrial devido a redução dos níveis de NADPH. A ausência de NNT funcional em camundongos e no nematódeo *Caenorhabditis elegans* ocasionou diminuição da razão GSH/GSSG, comprometendo a remoção de H₂O₂ e levando ao estresse oxidativo mitocondrial (14,48,49). O silenciamento da NNT em células PC12 ocasionou redução da razão de GSH/GSSG e aumento dos níveis de H₂O₂ (50). Similarmente, o silenciamento de *Nnt* em células N27 foi associado a uma diminuição dos níveis de NADPH e de GSH e uma menor taxa de remoção de H₂O₂ e diminuição da viabilidade celular (51).

A maioria dos estudos mais recentes sobre a fisiologia da NNT empregou como modelo camundongos portando uma mutação em *Nnt* (*Nnt*^{C57BL/6J}) que ocorreu espontaneamente e se fixou entre 1970 e 1980 na colônia de camundongos C57BL/6J mantida no The Jackson Laboratory (52). Trata-se de uma deleção de 17,5 Kb no DNA genômico da *Nnt* que resulta em uma proteína não funcional, cuja expressão não é detectável nos tecidos desses animais (11,53). Camundongos portando a mutação *Nnt*^{C57BL/6J} são conhecidos por apresentar baixa secreção de insulina e intolerância à glicose (11,49,53), além de outras alterações fenotípicas relacionadas ao estresse

oxidativo. A mutação *Nnt*^{C57BL/6J} foi relacionada ao desequilíbrio redox em mitocôndrias do fígado de camundongos, associado a uma menor razão GSH/GSSG, menor habilidade mitocondrial de metabolizar peróxidos e maior susceptibilidade a transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca²⁺ (14,54,55).

Em um contexto mais funcional, foi demonstrado que camundongos portando a mutação *Nnt*^{C57BL/6J} quando alimentados com uma dieta rica em gordura, apresentam um agravamento da doença hepática não alcoólica, com progressão de esteatose para esteatohepatite não alcoólica (54). A condição de dieta rica em gordura associada a presença da mutação *Nnt*^{C57BL/6J} também foi relacionada ao desequilíbrio redox cérebro de camundongos (22). Outros estudos relacionaram a mutação *Nnt*^{C57BL/6J} a outras alterações fisiopatológicas em camundongos, como por exemplo disfunção endotelial, aterosclerose e hipertensão, ocasionadas pelo aumento de EROs vascular (55–58).

1.4 Inibidores químicos da NNT

A contribuição da NNT para diferentes situações fisiológicas e patológicas pode ser estudada por meio do uso de técnicas de silenciamento, transgenia e camundongos portando a mutação *Nnt*^{C57BL/6J}, como exemplificado anteriormente. No entanto, esses modelos apresentam algumas possíveis desvantagens provenientes de efeitos adversos em virtude da ausência de NNT e a possibilidade de compensações fisiológicas, como por exemplo, aumentos compensatórios na expressão e/ou atividade enzimática de outras fontes de NADPH (33,54). Nesse sentido, a existência de compostos químicos capazes de inibir a NNT com especificidade seria de grande valor em algumas abordagens experimentais.

O uso de inibidores químicos para estudo da NNT vem sendo relatado na literatura desde os anos 1970 (**Tabela 1**). Apesar disso, os mecanismos de inibição e especificidade desses compostos não foram abordados sistematicamente em contextos funcionais. É importante ressaltar que uma menor parte dos estudos utilizando inibidores químicos da NNT empregou esses compostos em contextos funcionais (7 dos 19 consultados no presente trabalho), enquanto na maioria dos estudos esses compostos foram empregados para análises estruturais e cinéticas da NNT. Ao longo da história de estudos sobre a NNT, foram caracterizados vários

inibidores químicos desta proteína, dentre os quais selecionamos os compostos N,N'diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-CI), palmitoil coenzima A e rhein (4,5-dibydroxyanthraquinone-Z-carboxílico), por terem sido utilizados com maior frequência. As principais características desses compostos serão brevemente apresentadas a seguir.

Inibidor	Tipo de estudo	Amostra	Referência	
		Mitocôndrias permeabilizadas	(59)	
	Atividada	Partículas submitocondriais (SMP)	(60)	
DCC	Alividade	Proteína purificada	(61,62)	
	Funcional	Mitocôndrias intactas	(63)	
	Atividade	Mitocôndrias permeabilizadas	(18)	
NBD		Proteína purificada	(64,65)	
	Funcional	Cardiomiócitos permeabilizados	(17,66)	
		Células	(51)	
		Mitocôndrias permeabilizadas	(15,18)	
	Atividade	Partículas submitocondriais	(67)	
Paimitoyi-CoA		Proteína purificada	(68,69)	
	Funcional	Células	(51)	
	FUNCIONAL	Mitocôndrias intactas	(40,51)	
	Atividade	Proteína purificada	(70,71)	
Rhein	Funcional	Mitocôndrias intactas	(72)	
		Fígado perfundido	(73)	

Tabela 1 – Uso de compostos químicos inibidores de NNT na literatura.

O DCC é um composto orgânico com propriedade de reação com grupos carbonis de aminoácidos, promovendo a inibição da NNT em concentrações milimolares (60,62). A inibição da NNT por DCC parece envolver a sua ligação no sítio de ligação de NAD(H), impedindo a atividade da enzima. Notadamente, verificou-se que NAD(H) protege a NNT do efeito inibitório de DCC (74). Apesar do DCC ser utilizado em vários estudos como um inibidor da NNT, outras enzimas mitocondriais, como a ATP sintase, também podem ser inibidas por este composto (75).

O NBD-CI é utilizado em ensaios de fluorescência, para marcar grupos sulfidrilas e terminais N de proteínas. Acredita-se que o NBD-CI tenha a capacidade de reagir com diferentes grupos funcionais de acordo com o pH em que se encontra; em pH 7,0 reagiria com tióis e hidroxila fenólico de tirosina, e em pH 8,0 e acima, com grupos amino. O NBD-CI também pode ser transferido de tirosina para resíduos de lisina em pH mais alto (64). O NBD-CI é considerado na literatura um inibidor eficaz da NNT, sendo proposto que este efeito ocorra através da modificação de alguns domínios presentes na estrutura molecular da enzima, gerando assim sua inibição (60,65). Apesar do NBD ser utilizado como inibidor da NNT, outros estudos também mostram que o NBD possui a capacidade de formar um complexo com o citocromo *c*, componente da cadeia respiratória mitocondrial, impedindo que ocorra oxidações geradas por este (76).

O palmitoil coenzima A (palmitoil-CoA) é um derivado de coenzima de ácido graxo que desempenha um papel fundamental na oxidação e na biossíntese de ácidos graxos (77). Esse composto também é referido na literatura como um potente inibidor da NNT (67). Acredita-se que sua atuação como inibidor da NNT ocorra por competição com o sítio de ligação do NADP(H), afetando a reação de transidrogenização, acoplada ou não com o transporte de H⁺ (78). Além de ser utilizado em alguns estudos como inibidor da NNT, o palmitoil-CoA também foi utilizado para inibir o canal condutor de aníons dependente do pH na membrana interna de mitocôndrias de fígado de rato (79) e a piruvato desidrogenase em mitocôndrias de adipócitos (80).

O rhein é um composto natural derivado do rizoma do ruibarbo, sendo uma das principais antraquinonas encontradas na espécie de ruibarbo *Rheum palmatum L* (81), mas também em outras espécies de *Rheum sp*, um gênero de ervas amplamente utilizadas na medicina popular em alguns países (82). A possibilidade de utilização do

rhein como fármaco para o tratamento de desordens diversas já foi explorada em alguns trabalhos (30,81,83). Foi proposto que o rhein inibe a oxidação de NADH pela NNT, sendo que esta inibição ocorreria de forma competitiva (70). No entanto, o rhein também foi descrito na literatura como inibidor competitivo de outras enzimas dependentes de NAD(H) como o complexo respiratório I e malato desidrogenase (70,71,84).

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo geral avaliar se os inibidores químicos da NNT são eficazes na inibição da atividade de NNT sem afetar a função respiratória mitocondrial. Diante disso, os objetivos específicos foram:

- Determinar a inibição das reações direta e reversa catalisadas pela NNT na presença de diferentes concentrações de DCC, NBD-CI, palmitoil-CoA e rhein.
- Determinar o efeito na fosforilação oxidativa mitocondrial das concentrações de DCC, NBD-CI, palmitoil-CoA e rhein que se mostrarem eficazes em inibir a NNT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos utilizados no **Capítulo I** encontram-se descritos na seção correspondente do artigo que compõe esse item dos **Resultados**.

3.1 Modelos experimentais

Para a realização dos experimentos do presente trabalho, utilizamos mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos adultos-jovens com e sem *Nnt* funcional (C57BL/6JUnib *Nnt*^{+/+} e C57BL/6JUnib *Nnt*^{+/-}, respectivamente) com 3 a 5 meses de idade; ou astrócitos isolados do córtex de camundongos neonatos sem *Nnt* funcional (C57BL/6JUnib *Nnt*^{-/-}), entre 2 a 3 dias de idade.

O uso de camundongos adultos-jovens permite obter quantidade suficiente de mitocôndrias isoladas de fígado para os experimentos, enquanto camundongos neonatos são necessários para a obtenção de cultura de astrócitos apresentando boa viabilidade e proliferação.

3.2 Estado redox de NAD(P)

A variação do estado redox do NAD(P) em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo foi determinada em espectrofluorímetro (Hitachi F-7000) usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 366 e 450 nm, respectivamente, e larguras de fenda de 5 nm. Suspensões mitocondriais (0,5 mg/mL) foram incubadas em meio contendo 125 mM de sacarose, 65 mM KCl,10 mM HEPES, 2 mM K₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM glutamato e 2,5 mM de malato, com o pH ajustado para 7,2 com KOH. O sistema mitocondrial metabolizador de peróxido suportado por NADPH foi desafiado com a adição de *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH, 10 μ M), um peróxido orgânico metabolizado através do sistema glutationa peroxidase/glutationa redutase e tiorredoxina peroxidase/peroxirredoxina, portanto às custas de NADPH (85). Tais medidas foram feitas em condição controle na presença de 0,25% de etanol ou na presença de 1, 2 ou 5 μ M de NBD-Cl. No final da reação foi feita uma adição do desacoplador carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP, 1 μ M).

4. RESULTADOS

4.1 Capítulo I

Bicego R, Francisco A, Ruas JS, Siqueira-Santos ES, Castilho RF.

"Undesirable effects of chemical inhibitors of NAD(P)⁺ transhydrogenase on mitochondrial respiratory function."

Archives of Biochemistry and Biophysics, 692: 108535, 2020.

FISEVIER



Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi

Undesirable effects of chemical inhibitors of NAD(P)⁺ transhydrogenase on mitochondrial respiratory function

Rafaela Bicego, Annelise Francisco^{*}, Juliana S. Ruas, Edilene S. Siqueira-Santos, Roger F. Castilho^{**}

Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

A	R	Т	I	С	L	Е	I	Ν	F	0	

Keywords: Mitochondria Antioxidant Reactive oxygen species Redox balance NAD(P)H ABSTRACT

NAD(P)⁺ transhydrogenase (NNT) is located in the inner mitochondrial membrane and catalyzes a reversible hydride transfer between NAD(H) and NADP(H) that is coupled to proton translocation between the intermembrane space and mitochondrial matrix. NNT activity has an essential role in maintaining the NADPH supply for antioxidant defense and biosynthetic pathways. In the present report, we evaluated the effects of chemical compounds used as inhibitors of NNT over the last five decades, namely, 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl), *N*,*N*'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), palmitoyl-CoA, palmitoyl-L-carnitine, and rhein, on NNT activity and mitochondrial respiratory function. Concentrations of these compounds that partially inhibited the forward and reverse NNT reactions in detergent-solubilized mouse liver mitochondria significantly impaired mitochondrial respiratory function, as estimated by ADP-stimulated and nonphosphorylating respiration. Among the tested compounds, NBD-Cl showed the best relationship between NNT inhibition and low impact on respiratory function and significantly decreased the viability of cultured *Nnt^{-/-}* mouse astrocytes. We conclude that even though the tested compounds indeed presented inhibitory effects on NNT activity, at effective concentrations, they cause important undesirable effects on mitochondrial respiratory function and cell viability.

1. Introduction

The transmembrane mitochondrial protein NAD(P)⁺ transhydrogenase [also known as nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT)] is uniquely able to directly connect matrix NAD(H) and NADP (H) pools and the proton-motive force across the inner membrane. Structurally, NNT is composed of three domains; domains I and III are hydrophilic and have binding sites for NAD and NADP, respectively, while domain II is hydrophobic and is a transmembrane pathway through which protons translocate [1]. NNT forms dimers, whose monomers act in an anti-phase way; domain III (NADP(H)-binding) flips, allowing proton translocation across the inner mitochondrial membrane one moment and favoring hydride transfer between NAD(H) and NADP (H) the next [2]. The NNT reaction is reversible and occurs to generate NADPH (forward) in most physiological conditions [3], while the reverse NNT reaction may be relevant to certain physiological and pathological circumstances [4-6].

Recently, increased attention has been drawn to NNT pathophysiological roles after the discovery of a spontaneous *Nnt* mutation in C57BL/6J mice [7,8] and disease-causing *Nnt* mutations in humans [9–11]. Interestingly, *Nnt* silencing reduced the growth of cancer cell lines, suggesting that NNT might be a therapeutic target in some cancers [12–14]. In this sense, the search for suitable NNT inhibitors would be an expected approach.

Over the last five decades, several compounds have been used to inhibit NNT activity to elucidate the functional mechanisms of NNT, its influence on mitochondrial and cellular metabolism, and/or its pathophysiological roles. Among the compounds employed as NNT inhibitors, 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl), *N*,*N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), palmitoyl-CoA, and 4,5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid (rhein) catch greater attention because of their recurrence in specialized literature. The use of these compounds as NNT inhibitors is briefly described next.

NBD-Cl was first employed to study functional mechanisms of NNT

https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108535 Received 22 June 2020; Accepted 31 July 2020 Available online 8 August 2020 0003-9861/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.



^{*} Corresponding author.

^{**} Corresponding author.

E-mail addresses: annelisef28@gmail.com (A. Francisco), rogerc@unicamp.br (R.F. Castilho).

[15,16], and later studies used NBD-Cl to inhibit NNT in both cells and isolated mitochondria [6,17,18]. NNT inhibition by NBD-Cl is mediated by its reaction with cysteines and lysines near the NADP(H)-binding site [15,16]. DCC has been employed as an NNT inhibitor since early studies on NNT mechanisms and function [19–21]. These studies suggested that DCC inhibits NNT allosterically by interfering with substrate binding at the NAD(H) site and by inhibiting catalytic activity and proton translocation [22]. Rhein, an anthraquinone naturally found in rhubarb species used as medicinal herbs, was employed as an NNT inhibitor at the very beginning of NNT functional characterization. Rhein was proposed to be a competitive inhibitor of NNT activity [23,24] and used to preclude NNT activity in isolated rat liver mitochondria [25].

In contrast to the above-described compounds, palmitoyl-CoA naturally occurs in the cytosol and mitochondrial matrix, taking part in the biosynthesis of sphingolipids and β -oxidation [26]. However, studies using preparations of purified NNT and submitochondrial particles [27–29] indicated that palmitoyl-CoA might be a potent competitive NNT inhibitor [27]. More recently, palmitoyl-CoA has also been employed to inhibit NNT in cell lines and isolated mitochondria from humans and mice [18,30–32].

Although the abovementioned compounds have been used as NNT inhibitors, it remains doubtful whether they are suitable to be employed in pathophysiological contexts [5]. In view of possible problems related to the selectivity of NNT inhibitors, the present study systematically characterized the NNT inhibitors most frequently found in the literature concerning their inhibitory effects on forward and reverse NNT reactions and mitochondrial respiratory function.

2. Material & methods

Reagents – 3-Acetylpyridine adenine dinucleotide (APAD; catalog number: A5251), adenosine diphosphate monopotassium salt (ADP; cat. A5285), L-carnitine hydrochloride (cat. C0283), 4-chloro-7-nitrobenzo-furazan (NBD-Cl; cat. 163260), *N*,*N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC; cat. D3128), L-glutamic acid potassium salt (cat. G1501), lysolecithin (cat. L5254), L-malic acid (cat. M1000), NADH dipotassium salt (cat. N4505), NADPH tetrasodium salt (cat. N1630), oligomycin (cat. O4876), palmitoyl-L-carnitine chloride (cat. P1645), palmitoyl coenzyme A (palmitoyl-CoA) lithium salt (cat. P9716), rhein (cat. R7269), rotenone (cat. R8875), and most other chemicals were obtained from Merck (St. Louis, MO, USA). Thionicotinamide adenine dinucleotide phosphate potassium salt (thio-NADP, cat. sc-394300) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Stock solutions of ADP, glutamate, and malate were prepared by dissolving the compounds in water and adjusting the pH to 7.2 with KOH.

Stock solutions of the NNT inhibitors were prepared according to their chemical features as follows: NBD-Cl was dissolved in ethanol (for experiments with isolated mitochondria) or DMSO (for experiments with astrocytes), DCC was dissolved in methanol, palmitoyl-L-carnitine chloride and palmitoyl-CoA lithium salt were dissolved in water, and rhein solution was prepared in 0.1 M NaOH.

Animals – Adult female C57BL/6/JUnib mice (3–5 months old) were obtained from the Campinas University Multidisciplinary Center for Biological Research in Laboratory Animal Science (CEMIB/UNICAMP, Campinas, Brazil). C57BL/6/JUnib mice are homozygous for wild-type *Nnt* alleles (*Nnt*^{+/+}). Adult female and neonate mice of the strain C57Unib.B6-*Nnt*^{-/-}, which are homozygous for the mutated *Nnt*^{C57BL/6J} allele (*Nnt*^{-/-}), were obtained from a colony maintained at a local department's animal facility. C57BL/6/JUnib and C57Unib.B6-*Nnt*^{-/-} mice are comparable to each other since they share the same genetic background, as described previously [33,34]. Before the experiments, the animals were maintained under standard laboratory conditions (22–24 °C and 12/12-h light/dark cycle) with free access to tap water and standard diet (NuvilabCR1, Nuvital, Colombo, PR, Brazil). Adult mice were euthanized by cervical dislocation prior to harvesting the liver for mitochondrial isolation. Mouse neonates were euthanized by

decapitation after inhalation anesthesia with isoflurane.

Mouse use and experimental protocols were approved by the local Committee for Ethics in Animal Research (CEUA - University of Campinas, approval numbers 4715-1/2017 and 4906-1/2018). The animal procedures complied with the Brazilian National Council Control in Animal Experiments (CONCEA) guidelines, the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines.

Mitochondrial Isolation - Intact mitochondria were isolated from the livers of adult female mice by tissue homogenization and differential centrifugation as described previously [31]. The protein concentrations of mitochondrial suspensions were determined using a Bradford protein assay (cat. B6916, Merck) in the presence of 0.1% Triton X-100 (cat. T9284, Merck).

Oxygen consumption measurements – Mitochondrial respiration was determined using a high-resolution oxygraph (OROBOROS Oxygraph-2k, Innsbruck, Austria). Mitochondrial suspensions (0.5 mg/mL) were incubated in medium containing 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM K₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 5 mM glutamate and 2.5 mM malate, with the pH adjusted to 7.2 with KOH. The tested compounds were added at the beginning of assays at the concentrations indicated in the figures. The maximal concentrations of ethanol, methanol and NaOH in the incubation medium were 0.25%. 0.05% and 0.1 mM, respectively. The same amounts of these compounds were tested in controls, and they did not significantly change the evaluated parameters by themselves. The oxygen consumption rate was measured after the addition of 500 μ M ADP (ADP-stimulated respiration, state 3) and in the nonphosphorylating respiratory state (state 4_o) induced by the addition of 1 μ g/mL oligomycin.

NNT activity - The progress of the forward transhydrogenase reaction was monitored spectrophotometrically at 400-460 nm as the reduction of thio-NADP⁺ (300 μ M) by NADH (300 μ M), as described elsewhere [35,36]. The reverse transhydrogenase reaction was spectrophotometrically followed at 375-425 nm as the reduction of APAD (300 μ M) by NADPH (300 μ M), as described previously [34]. Both the forward and reverse reactions were evaluated using 200 µg/mL mitochondrial protein in medium containing 50 mM Tris buffer (pH 7.2), 300 µg/mL lysolecithin, 0.5% Brij-35 and 2 µM rotenone. The tested compounds were added at the beginning of the assays at the concentrations indicated in the figures. The maximal concentrations of ethanol, methanol and NaOH in the incubation medium were 0.25%. 0.8% and 0.2 mM, respectively. The same amounts of these compounds were tested in controls, and they did not significantly change the activity measurements by themselves. The specific enzymatic activities were determined using the data points between 0.5 and 2.5 min after initiating the reactions by the addition of NADH or NADPH. The slopes of absorbance over time were converted to mU/mg using molar extinction coefficients of 10.6 mM⁻¹cm⁻¹ for reduced thio-NADP and 5.1 $mM^{-1}cm^{-1}$ for reduced APAD [35,37].

Astrocyte cell culture - Primary cultures of astrocytes were prepared from the cerebral cortices of five or six C57Unib.B6-Nnt^{-/-} neonates at postnatal day 2, as described elsewhere [38,39] but with minor modifications. After inhalatory anesthesia with isoflurane, the neonates were cleaned with 70% ethanol and euthanized by decapitation. The brains were removed and washed in phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 g/L glucose, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (DMEM). The meninges, olfactory bubs and cerebellum were removed to retrieve the cortices, which were minced and incubated in 30 μM trypsin at 37 °C. After 20 min, culture medium (DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum) containing 1 mg/mL DNAse was added to the trypsin-digested tissue. The cells were dissociated with a serum-coated pipette, and the homogenate was filtered through a 100 µm mesh cell strainer. Next, the homogenate was centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and the pellet was resuspended in culture medium supplemented with 4% bovine serum albumin and

centrifuged again. The resulting cells were plated in a 75 cm² culture flask with Cell+ Surface (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) containing culture medium at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After three days, the flask was placed in an orbital shaker at 230 rpm for 3 h. Then, the medium was discarded, and the astrocytes that remained adhered to the flask were maintained in culture. Astrocytes at passages 2–3 were seeded in 24-well tissue culture plates (15,000 cells/cm²; growth area: 1.9 cm²). After 12 h, some wells were analyzed for cell number and viability (t = 0 h), while in the remaining wells, the medium was replaced with culture medium containing 0.05% DMSO or NBD-Cl at 5, 10 or 20 μ M. After 48 h, the astrocyte cultures were photographed on a Leica DM IRB inverted microscope (Leica Inc., Foster City, CA, USA) and analyzed for cell number and viability.

Astrocyte counting – To count the number of viable cells, the medium was removed from the wells at t = 0 h or t = 48 h (after incubation with NBD-Cl or DMSO), and the adhered astrocytes were trypsinized and centrifuged. The cell pellets were suspended in 0.4% trypan blue (cat. T6146, Merck) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), and then the viable cells were counted in a Neubauer chamber.

Astrocyte viability – Cellular viability was evaluated by the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan crystals by metabolically active cells, as described previously [40]. Briefly, the medium was removed from wells at t = 0 h or t = 48 h, and the adhered astrocytes were washed once with PBS. Then, 1 mL of a 1 mg/mL MTT solution in phenol-free DMEM was added to the wells. After incubation for 90 min at 37 °C, an equal volume of 10% SDS in 0.01 M HCl was added to each well and incubated overnight. The amount of blue formazan generated was determined spectrophotometrically by the differential absorbance at 570–650 nm.

Cell viability was also analyzed using the CellTiter-Glo assay (Promega, cat. G5771), which determines ATP content. Briefly, the medium was removed from the wells at t = 0 h or t = 48 h, and the adhered astrocytes were washed once with PBS. Next, the astrocytes were lysed by adding 1 mL of a solution containing 25 mM Tris buffer (pH 7.8), 2 mM DL-dithiothreitol, 2 mM EDTA, 10% glycerol, and 1% Triton X-100 as previously described [41]. Then, the ATP content of the cell lysate was measured following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis – Data are shown as the mean + standard deviation of samples represented by individual symbols in bars. In

experiments using mitochondria, each data point represents an experiment performed with independent mitochondrial isolation. In cell culture experiments, each data point represents an independent experiment performed with a different passage and/or astrocyte culture. Since the normality assumptions were met, data were analyzed by either repeated measurements one-way or two-way ANOVA, where appropriate, followed by Bonferroni post hoc test, at the minimal significance level of 0.05. GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis and plotting graphs.

3. Results

3.1. Effects of chemical compounds on NNT activity and mitochondrial respiratory function

In Fig. 1, panels A and B show typical traces of enzymatic assays for the forward and reverse NNT reactions, respectively, obtained in detergent-solubilized mouse liver mitochondria. Upon the addition of NADH or NADPH, a progressive and stable increase in absorbance signals was observed due to the reduction of thio-NADP⁺ or APAD (NADP⁺ and NAD⁺ analogs), respectively. Negative control experiments were conducted using liver mitochondria isolated from $Nnt^{-/-}$ mice, and they showed no progressive increase in absorbance after either NADH or NADPH addition, validating experimental conditions for the evaluation of usual NNT chemical inhibitors. Fig. 1C depicts a representative trace of the classic evaluation of respiratory function in isolated mitochondria, including the determination of ADP-stimulated respiration ("state 3") and nonphosphorylating respiration ("state 4_{oligomycin}" or "state 4_o") upon addition of the ATP synthase inhibitor oligomycin. The respiratory control ratio, a classic parameter for estimating mitochondrial bioenergetic function [42,43], was the ratio between the values of respiratory states 3 and $4_{\rm o}.$ Next, these experimental protocols were employed to evaluate the effects of the compounds NBD-Cl, DCC, palmitoyl-CoA, palmitoyl-L-carnitine, and rhein on mitochondrial NNT activity and respiratory function.

NBD-Cl caused complete inhibition of the forward (Fig. 2A) and reverse (Fig. 2B) NNT reactions at concentrations of 40 and 20 μ M, respectively. However, NBD-Cl at concentrations nearly one order of magnitude lower induced a significant decrease in respiratory control



Fig. 1. Representative traces of NNT activity and mitochondrial respiratory function assays. (A) Forward mode of NNT activity was assessed in detergentsolubilized liver mitochondria by monitoring the increase in differential absorbance (400–460 nm) due to thio-NADP⁺ reduction. After 1.5 min of mitochondrial incubation, the reaction was initiated by the addition of 300 μ M NADH, as indicated by the arrow. The blue trace represents an experiment performed with $Nnt^{+/+}$ mitochondria, while the red trace represents the corresponding experiment with $Nnt^{-/-}$ mitochondria, which were used to validate the assay. (B) Reverse mode of NNT activity was determined in detergent-solubilized liver mitochondria by measuring the increase in differential absorbance (375–425 nm) due to APAD reduction. After 1.5 min of mitochondrial incubation, the reaction was initiated by 300 μ M NADPH. (C) The oxygen consumption rate by intact mouse liver mitochondria was determined in medium containing glutamate and malate as respiratory substrates. Where indicated by the arrows, 500 μ M ADP was added to the reaction medium, followed by 1 μ g/mL oligomycin, inducing ADP-stimulated (state 3) and nonphosphorylating respiratory states (state 4_o), respectively. The respiratory control ratio (RC) was determined by the ratio between respiratory states 3 and 4_o. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



Fig. 2. Effects of NBD-Cl on forward and reverse modes of NNT activity and mitochondrial respiratory function. Mitochondrial suspensions were incubated in the absence (control) or in the presence of NBD-Cl concentrations ranging from 1 to 50 μ M. Dose-dependent effects of NBD-Cl on the mitochondrial NNT forward reaction (**A**), the NNT reverse reaction (**B**), and respiratory function (**C**). Respiratory control ratios (**D**) were calculated using the data shown in panel **C**. *Significantly different from control, p < 0.05; **significantly different from control, p < 0.01.

ratio due to both inhibition of ADP-stimulated and increased non-phosphorylating respiration (Fig. 2C and D). Preincubation of mitochondrial suspensions with NBD-Cl (2–5 μ M) for 20 min did not increase the inhibitory effect of this compound on NNT activity, while the preincubation period alone worsened the respiratory control ratio (Fig. S1).

DCC caused a dose-dependent inhibition of NNT activity, and at a concentration of 800 μ M, DCC nearly completely inhibited the forward and reverse NNT reactions (Fig. 3A and B). DCC at much lower concentrations (e.g., 5 μ M) strongly decreased the respiratory control ratio due to inhibition of ADP-stimulated respiration and increasing non-phosphorylating respiration (Fig. 3C and D).

Palmitoyl-CoA concentrations up to 1000 µM and 300 µM were required for complete inhibition of the forward (Fig. 4A) and reverse (Fig. 4B) modes of NNT activity, respectively. However, palmitoyl-CoA at concentrations two orders of magnitude lower already triggered a significant decrease in the respiratory control ratio, mostly due to an inhibition of ADP-stimulated respiration (Fig. 4C and D). Similar results on NNT activity and mitochondrial respiratory function were obtained when palmitoyl-CoA was incubated in the presence of carnitine (2 mM) (Fig. 5A–D). Carnitine was included in these assays because palmitoyl-CoA does not freely permeate the mitochondrial inner membrane. In the presence of carnitine, the enzyme carnitine palmitoyltransferase I in the outer membrane catalyzes the transfer of the palmitoyl group from palmitoyl-CoA to carnitine, forming palmitoylcarnitine. Palmitoylcarnitine is transported to the mitochondrial matrix, where it is converted back into palmitoyl-CoA by carnitine palmitoyltransferase II [26].

Palmitoyl-L-carnitine shows a weak inhibitory effect on the NNT forward reaction, with only 21.9 \pm 5.2% inhibition at 1000 μM (Fig. 6A). The most potent inhibitory effect of palmitoyl-L-carnitine was observed on the NNT reverse reaction, with 78.5 \pm 7.8% inhibition at 1000 μM (Fig. 6B). Palmitoyl-L-carnitine at concentrations one order of magnitude lower resulted in a strong inhibition of ADP-stimulated respiration (Fig. 6C), significantly decreasing the respiratory control ratio (Fig. 6D).

Finally, the effect of rhein on NNT activity was tested. Only partial



Fig. 3. Effects of DCC on forward and reverse modes of NNT activity and mitochondrial respiratory function. Mitochondrial suspensions were incubated in the absence (control) or in the presence of DCC concentrations ranging from 5 to 800 μ M. Dose-dependent effects of DCC on the mitochondrial NNT forward reaction (A), the NNT reverse reaction (B), and respiratory function (C). Respiratory control ratios (D) were calculated using the data shown in panel C. *Significantly different from control, p < 0.05; **significantly different from control, p < 0.01.

inhibition (22.3 \pm 1.9 and 20.7 \pm 2.1%) of the forward and reverse NNT reactions was observed in the presence of 40 μ M rhein (Fig. 7A and B). Due to the strong orange color of rhein, it was not possible to test concentrations of this compound higher than 80 μ M and 40 μ M in the NNT forward and reverse enzymatic assays, respectively. At 40 μ M, rhein caused an increase in nonphosphorylating respiration and a nonsignificant trend in inhibition of ADP-stimulated respiration (Fig. 7C). Therefore, an important decrease (50.8 \pm 5.8%) in the respiratory control ratio was observed in the presence of 40 μ M rhein (Fig. 7D).

In Fig. 8, panels A and B summarize the results of all tested chemical compounds in the inhibition of forward and reverse NNT reactions, respectively, and their effects on the respiratory control ratio. In these charts, the more towards the right the line is placed, the better the NNT inhibition by the compound concerning the relationship between NNT inhibition and side effects on mitochondrial respiratory function. Among the tested compounds, NBD-Cl showed the best relationship between NNT inhibition and low impact on respiratory control, while the worst relationships were observed for DCC and palmitoyl-L-carnitine.

3.2. NBD-Cl at concentrations that partially inhibit NNT activity is toxic to cultured $\rm Nnt^{-/-}$ astrocytes

The results described above indicated NBD-Cl as the most effective NNT inhibitor. In this sense, the effects of this compound at concentrations that were partially effective in inhibiting NNT activity on the viability of mouse astrocytes in primary culture were tested (Fig. 9). Astrocytes from $Nnt^{-/-}$ mice were used to ensure that the effects of NBD-Cl were independent of NNT inhibition. Astrocyte viability was evaluated by the number of viable cells, MTT assay and ATP cellular levels after a 48 h incubation period at different concentrations of NBD-Cl (5, 10 and 20 µM). Panels A, B and C show representative microphotographs of the astrocytes, evidencing toxic effects of NBD-Cl at 10 and 20 µM. Cell shrinkage and rounding, typical features of apoptosis, were observed after incubation in the presence of NBD-Cl. A significant decrease in astrocyte viability was observed at 10 and 20 µM NBD-Cl (Fig. 9D and F). The MTT assay was the least sensitive test for NBD-Cl toxicity (Fig. 9E), which is possibly explained by the presence of residual MTT reduction activity in dying astrocytes.



Fig. 4. Effects of palmitoyl-CoA on forward and reverse modes of NNT activity and mitochondrial respiratory function. Mitochondrial suspensions were incubated in the absence (control) or in the presence of palmitoyl-CoA concentrations ranging from 1 to 1000 μ M. Dose-dependent effects of palmitoyl-CoA on the mitochondrial NNT forward reaction (A), the NNT reverse reaction (B), and respiratory function (C). Respiratory control ratios (D) were calculated using the data shown in panel C. *Significantly different from control, p < 0.05; **significantly different from control, p < 0.01.

4. Discussion

Chemical inhibitors have been used to reveal the mechanisms of NNT and its physiological roles since early reports on its activity. Here, we revisited some of the compounds historically referred to as NNT inhibitors to evaluate their selectivity and suitability for intact isolated mitochondria. Among these inhibitors, NBD-Cl was the most promising one, even though NBD-Cl concentrations that partially inhibited NNT activity impaired mitochondrial respiratory function and were toxic to primary cultured *Nnt*^{-/-} astrocytes. The absence of NNT activity in these astrocytes dismisses speculation that such toxicity is due to NNT inhibition by NBD-Cl. A detailed discussion about the features of each inhibitor is presented below.

NBD-Cl reacts primarily with sulfhydryl groups, but it can also react with amino and phenolic hydroxyl groups [16,44,45]. NNT inhibition by NBD-Cl is mainly attributed to the latter's reaction with cysteine sulfhydryl groups (β Cys-147 and β Cys-260 of *Escherichia coli* transhydrogenase) [15,16]. Nevertheless, NBD-Cl can inhibit both the synthetic and hydrolytic activities of mitochondrial ATP synthase by a covalent reaction with the phenolic hydroxyl group of tyrosine (β Tyr-311 of bovine ATP synthase) in a catalytic site of β subunits [46–48]. Approximately 150 μ M NBD-Cl fully inhibited the ATP synthase activity of *Escherichia coli* [49], while 100 μ M NBD-Cl almost completely inhibited the activity of ATP synthase from bovine heart after a 60 min incubation [50]. These NBD-Cl concentrations are at least twice as large as those required to fully inhibit NNT activity as reported here.

NBD-Cl has been recently employed as an NNT inhibitor [6,17,18]. Although NBD-Cl presented the best performance among the tested compounds concerning NNT inhibition, with less impairment of mitochondrial respiratory function, the present report did not validate this inhibitor for functional studies in intact mitochondria or cells. However, this compound might be a prototype for chemical NNT inhibitors. In fact, NBD-Cl derivatives of CoA and dephospho-CoA were reported to be strong NNT inhibitors possibly by interacting with both NADP(H) and NAD(H) binding sites of the enzyme [51].



Fig. 5. Effects of palmitoyl-CoA plus carnitine on forward and reverse modes of NNT activity and mitochondrial respiratory function. Mitochondrial suspensions were incubated in the absence (control) or in the presence of a combination of 2 mM carnitine plus palmitoyl-CoA concentrations ranging from 1 to 1000 μ M. Dose-dependent effects of palmitoyl-CoA plus carnitine on the mitochondrial NNT forward reaction (A), the NNT reverse reaction (B), and respiratory function (C). Respiratory control ratios (D) were calculated using the data shown in panel C. *Significantly different from control, p < 0.05; **significantly different from control, p < 0.01.

In some previous studies, samples were preincubated with NBD-Cl to potentiate its inhibitory effects on either ATP synthase or NNT [15,16, 46,49,50,52]. Under our experimental conditions, a 20 min preincubation did not significantly increase the inhibitory effect of NBD-Cl on NNT activity, while it worsened mitochondrial respiratory function under control conditions. Interestingly, the preincubation period did not further worsen the respiratory function of the NBD-Cl-treated mitochondria to the same extent as it affected mitochondria incubated in control conditions (see Fig. S1). Functional groups of several mitochondrial proteins might suffer changes during the 20-min preincubation under control conditions, e.g., oxidation of sulfhydryl groups [53], which were already rapidly modified in the presence of NBD-Cl [44,45,54]. Regarding the other compounds tested, a more detailed study on the effect of time of incubation on their inhibitory action was not performed, since (i) according to the literature, the time effect is not particularly intense and/or (ii) because of the great disparity between NNT inhibition and the effects on mitochondrial function.

In addition to inhibiting NNT, DCC has been described as a potent inhibitor of other mitochondrial enzymes or proteins, such as respiratory complexes (I, III and IV), ATP synthase, voltage-dependent anion channel and mitochondrial uncoupling protein [55–58]. Since DCC typically reacts with carboxyl groups [59], DCC-reactive glutamyl and aspartyl residues are the main sites related to the inhibition of these proteins. Low concentrations of DCC can inhibit ATP synthase as a result of its reaction with a glutamyl residue in the β subunit of the F₁ region (*E. coli* β Glu-192, bovine β Glu-199) [47,60,61]. DCC can also bind the ATP synthase F₀ region, inhibiting proton translocation and the ATPase activity of the coupled F₀F₁ complex [62]. These different targets of DCC on mitochondria align well with the strong inhibitory effect of this compound on respiratory function at 5 μ M without significant NNT inhibition at this concentration.

Nonspecific mitochondrial effects were also expected for palmitoyl-CoA. Free unbound long-chain acyl-CoA esters are estimated to occur in living liver cells at concentrations below 0.2μ M and to never exceed



Fig. 6. Effects of palmitoyl-L-carnitine on forward and reverse modes of NNT activity and mitochondrial respiratory function. Mitochondrial suspensions were incubated in the absence (control) or in the presence of palmitoyl-L-carnitine concentrations ranging from 1 to 1000 μ M. Dose-dependent effects of palmitoyl-L-carnitine on the mitochondrial NNT forward reaction (**A**), the NNT reverse reaction (**B**), and respiratory function (**C**). Respiratory control ratios (**D**) were calculated using the data shown in panel **C**. *Significantly different from control, p < 0.05; **significantly different from control, p < 0.01.

1 μ M [63]. Acyl-CoA thioesters and their long-chain fatty acids (e.g., palmitic acid) can interact with membranes and mitochondrial components [64–66]. At micromolar concentrations, palmitoyl-CoA depolarizes mitochondrial membrane potential and inhibits enzymes related to fatty acid synthesis and some mitochondrial transmembrane carriers [63,65]. Furthermore, long-chain fatty acids strongly affect the respiratory function of isolated mitochondria, which may explain metabolic dysfunctions in patients with disorders causing the accumulation of these compounds [67–69]. Interestingly, the size of the fatty acid moiety is relevant to the reported inhibitory effects of fatty acids and acyl-CoA thioesters on mitochondrial targets, with the strongest effect with chain lengths of 12–18 carbons [27,66,70]. This feature could be related to these compounds fitting the binding sites best, with palmitoyl-CoA usually exerting competitive inhibition [66].

Regarding NNT activity, the inhibitory effect of palmitoyl-CoA is competitive with respect to NADP(H). This might occur because of an interaction between the fatty acid moiety of palmitoyl-CoA and a hydrophobic region close to or in the NADP(H)-binding site, since such inhibition cannot be explained by a structural similarity between NADP (H) and palmitoyl-CoA [27]. Nonetheless, in the set of experiments presented here, palmitoyl-CoA at concentrations two orders of magnitude lower than those inhibiting NNT activity significantly impaired mitochondrial respiratory function. It is worth noting that the concentration of NADP(H) employed here (i.e., $300 \ \mu$ M) is within the range of those observed in the mitochondrial matrix of most tissues (e.g., brain, heart, kidney) [6,34,71,72] and lower than those measured for liver mitochondria [31,73,74].

Despite the effects mentioned above, palmitoyl-CoA is unable to permeate the intact mitochondrial membrane by itself and depends on its conversion to permeable forms to reach targets inside mitochondria. In this sense, the present study also addressed approaches that would allow the entrance of the palmitoyl moiety, namely, the use of palmitoyl-L-carnitine and palmitoyl-CoA plus carnitine [26]. These permeable forms also proved to be quite toxic to isolated mitochondria, with minor effects on NNT activity. Interestingly, a previous report has shown that the use of 20 μ M palmitoyl-L-carnitine as a respiratory substrate for



Fig. 7. Effects of rhein on forward and reverse modes of NNT activity and mitochondrial respiratory function. Mitochondrial suspensions were incubated in the absence (control) or in the presence of rhein concentrations ranging from 2.5 to 80 μ M. Dose-dependent effects of rhein on the mitochondrial NNT forward reaction (**A**), the NNT reverse reaction (**B**), and respiratory function (**C**). Respiratory control ratios (**D**) were calculated using the data shown in panel **C**. *Significantly different from control, p < 0.05; **significantly different from control, p < 0.01.

intact isolated liver mitochondria did not worsen the NNT-mediated mitochondrial ability to metabolize peroxide [33]. Thus, despite the importance of studies on the competitive inhibition of NNT activity by palmitoyl-CoA [27] and the possibility of using this inhibitor as a positive control in enzymatic assays [18,27,31], its use for functional analysis in intact mitochondria has yet to be validated.

Rhein was previously described as a competitive inhibitor of several NAD(H)-dependent enzymes in addition to NNT, such as respiratory complex I, NAD(P)H quinone oxidoreductase, lactate dehydrogenase, and malate dehydrogenase [23,24,75]. This inhibitor may act between the substrate and the flavin of these enzymes, competing with respect to both NAD⁺ and NADH [24,75]. However, in the case of NNT, the inhibitory effect of rhein would not be site-specific [27] and would vary according to NAD and NADP concentrations [23,24]. Previous studies reported that 16.6 μ M rhein was able to inhibit approximately 80% of purified beef heart complex I activity and 50% of NNT activity of submitochondrial particles in the presence of a low NAD(P) concentration (20 μ M) in the assays [23,24]. Under our experimental conditions, a

similar concentration of rhein (i.e., 20 μ M) inhibited only approximately 15% of NNT activity in detergent-solubilized mitochondria and led to an important impairment of mitochondrial respiratory function. These data suggest that (i) rhein is more effective as an NNT inhibitor in purified enzymatic systems, probably due to a scavenging effect of other proteins present in the samples, as also observed elsewhere [23,24] and (ii) respiratory complex I and other mitochondrial components are affected to a larger extent than NNT by rhein, which at least in part would explain our results showing only a slight NNT inhibition but an important impairment of mitochondrial respiratory function in the presence of micromolar rhein concentrations.

The results presented here indicated that frequently used chemical NNT inhibitors can compromise mitochondrial respiratory function at concentrations able to partially preclude NNT activity. Such impairment of mitochondrial respiratory function by the tested compounds is unlikely to be mediated by their effects on NNT activity. Indeed, the inhibition of NNT activity was achieved only at concentrations of inhibitors one or two orders of magnitude higher than those that exerted



Fig. 8. Graphical summary of the effects of all tested chemical compounds on the inhibition of mitochondrial NNT activity versus that of respiratory control. Graphs show the percentage of inhibition for NNT forward (A) and reverse (B) reactions caused by different concentrations of compounds versus their respective inhibitory effects on respiratory control. Because the minimal value for respiratory control is one, the percentage of respiratory control inhibition was determined after subtracting one unit from the values obtained in the absence and presence of the NNT chemical inhibitors.



Fig. 9. NBD-Cl at micromolar concentrations is toxic to primary cultured astrocytes. $Nnt^{-/-}$ astrocytes were incubated for 48 h in the absence (control, 0.05% DMSO) or in the presence of NBD-Cl concentrations ranging from 5 to 20 μ M. (**A-C**) Representative micrographs of astrocytes after 48 h of incubation at different concentrations of NBD-Cl. Scale bars = 100 μ m. Dose-dependent effects of NBD-Cl on the number of viable astrocytes (**D**), MTT reduction activity (**E**), and cellular ATP content (**F**). The dotted lines in panels **D-F** represent the values of measurements performed at the time point at which the NBD-Cl treatments started (t = 0 h). *Significantly different from the control (at t = 48 h), p < 0.05; **significantly different from the control (at t = 48 h), p < 0.01.

effects on respiratory function. Besides, previous studies showed that the lack of NNT activity in mouse does not impair the respiratory function of isolated liver and brain mitochondria [33,34].

It is worth noting that NNT function can be evaluated using animal models or cells with the spontaneous *Nnt*^{C57BL/6J} mutation or using genetic tools to reduce or ablate *Nnt* expression [13,14,34,76,77]. However, even these *Nnt* mutant models may present disadvantages related to adaptive responses to genetic modifications, such as compensatory increases in other enzymes (e.g., NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and malic enzyme) or side effects due to the lack of NNT. In this sense, suitable chemical NNT inhibitors would be of great value in some experimental approaches. Hopefully, new and better chemical inhibitors can be designed based on recent studies on NNT structure and function [1,2].

We concluded that none of the chemical NNT inhibitors evaluated here were effective for functional studies with intact mitochondria or cells, and the use of any of these compounds as NNT inhibitors should be avoided or only done after a careful evaluation of their nonspecific mitochondrial and nonmitochondrial effects.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant numbers 15/22063-0, 17/17728-8 and 20/05202-4), the Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES – PNPD 88887.473373/2020–00), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online athttps://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108535.

References

- [1] J.H. Leung, L.A. Schurig-Briccio, M. Yamaguchi, A. Moeller, J.A. Speir, R.B. Gennis, C.D. Stout, Division of labor in transhydrogenase by alternating proton translocation and hydride transfer, Science 347 (2015) 178–181, https://doi.org/ 10.1126/science.1260451.
- [2] D. Kampjut, L.A. Sazanov, Structure and mechanism of mitochondrial protontranslocating transhydrogenase, Nature 573 (2019) 291–295, https://doi.org/ 10.1038/s41586-019-1519-2.
- J. Rydström, Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1757 (2006) 721–726, https://doi.org/10.1016/j. bbabio.2006.03.010.
- [4] L.R.B. Santos, C. Muller, A.H. De Souza, H.K. Takahashi, P. Spégel, I.R. Sweet, H. Chae, H. Mulder, J. Jonas, NNT reverse mode of operation mediates glucose control of mitochondrial NADPH and glutathione redox state in mouse pancreatic b -cells, Mol. Metab. 6 (2017) 535–547, https://doi.org/10.1016/j. molmet.2017.04.004.
- [5] J.B. Hoek, J. Rydström, Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase, Biochem. J. 254 (1988) 1–10.
- [6] A.G. Nickel, A. Von Hardenberg, M. Hohl, J.R. Löffler, M. Kohlhaas, J. Becker, J. C. Reil, A. Kazakov, J. Bonnekoh, M. Stadelmaier, S.L. Puhl, M. Wagner, I. Bogeski, S. Cortassa, R. Kappl, B. Pasieka, M. Lafontaine, C.R.D. Lancaster, T.S. Blacker, A. R. Hall, M.R. Duchen, L. Kästner, P. Lipp, T. Zeller, C. Müller, A. Knopp, U. Laufs, M. Böhm, M. Hoth, C. Maack, Reversal of mitochondrial transhydrogenase causes oxidative stress in heart failure, Cell Metabol. 22 (2015) 472–484, https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.008.
- [7] A.A. Toye, J.D. Lippiat, P. Proks, K. Shimomura, L. Bentley, A. Hugill, V. Mijat, M. Goldsworthy, L. Moir, A. Haynes, J. Quarterman, H.C. Freeman, F.M. Ashcroft, R.D. Cox, A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice, Diabetologia 48 (2005) 675–686, https://doi.org/ 10.1007/s00125-005-1680-z.
- [8] H.C. Freeman, A. Hugill, N.T. Dear, F.M. Ashcroft, R.D. Cox, Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitive trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice, Diabetes 55 (2006) 2153–2156, https:// doi.org/10.2337/db06-0358.
- [9] L.A. Metherell, J.A. Guerra-Assunção, M.J. Sternberg, A. David, Three-dimensional model of human nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) and sequencestructure analysis of its disease-causing variations, Hum. Mutat. 37 (2016) 1074–1084, https://doi.org/10.1002/humu.23046.
- [10] F. Roucher-Boulez, D. Mallet-Motak, D. Samara-Boustani, H. Jilani, A. Ladjouze, P.-F. Souchon, NNT mutations: a cause of primary adrenal insufficiency, oxidative

stress and extra-adrenal defects, Eur. J. Endocrinol. 175 (2016) 73–84, https://doi.org/10.1530/EJE-16-0056.

- [11] E. Meimaridou, J. Kowalczyk, L. Guasti, C.R. Hughes, F. Wagner, P. Frommolt, P. Nürnberg, N.P. Mann, R. Banerjee, H. Nurcin Saka, J. Paul Chapple, P.J. King, A. J.L. Clark, L.A. Metherell, Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency, Nat. Genet. 44 (2012) 740–742, https://doi.org/10.1038/ng.2299.
- [12] S. Li, Z. Zhuang, T. Wu, J.-C. Lin, Z.-X. Liu, L.-F. Zhou, T. Dai, L. Lu, H.-Q. Ju, Nicotinamide nucleotide transhydrogenase-mediated redox homeostasis promotes tumor growth and metastasis in gastric cancer, Redox Biol 18 (2018) 246–255, https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2018.07.017.
- [13] H. Ho, Y. Lin, G. Lin, P. Wu, M. Cheng, Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) deficiency dysregulates mitochondrial retrograde signaling and impedes proliferation, Redox Biol 12 (2017) 926–928, https://doi.org/10.1016/j. redox.2017.04.035.
- [14] V. Chortis, A.E. Taylor, C.L. Doig, M.D. Walsh, E. Meimaridou, C. Jenkinson, G. Rodriguez-Blanco, C.L. Ronchi, A. Jafri, L.A. Metherell, D. Hebenstreit, W. B. Dunn, W. Arlt, P.A. Foster, Nicotinamide nucleotide transhydrogenase as a novel treatment target in adrenocortical carcinoma, Endocrinology 159 (2018) 2836–2849, https://doi.org/10.1210/en.2018-00014.
- [15] B. Persson, A.F. Hartog, J. Rydström, J.A. Berden, NBD-Cl modification of essential residues in mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase from bovine heart, Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol. 953 (1988) 241–248, https://doi.org/10.1016/0167-4838(88)90031-3.
- [16] P.D. Bragg, C. Hou, Effect of NBD chloride (4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3diazole) on the pyridine nucleotide transhydrogenase of Escherichia coli, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1413 (1999) 159–171, https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00090-0.
- [17] M.A. Aon, S. Cortassa, C. Maack, B. O'Rourke, Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status, J. Biol. Chem. 282 (2007) 21889–21900, https://doi.org/10.1074/jbc.M702841200.
- [18] F.L. Sheeran, J. Rydström, M.I. Shakhparonov, N.B. Pestov, S. Pepe, Diminished NADPH transhydrogenase activity and mitochondrial redox regulation in human failing myocardium, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1797 (2010) 1138–1148, https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.04.002.
- [19] D.M. Clarke, P.D. Bragg, Purification and properties of reconstitutively active nicotinamide nucleotide transhydrogenase of Escherichia coli, Eur. J. Biochem. 149 (1985) 517–523, https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08955.x.
- [20] D.C. Phelps, Y. Hatefi, Inhibition of the mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase by dicyclohexylcarbodiimide and diethylpyrocarbonate, J. Biol. Chem. 256 (1981) 8217–8221.
- [21] D. Lê-Quôc, K. Lê-Quôc, Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria, Arch. Biochem. Biophys. 273 (1989) 466–478, https://doi.org/10.1016/0003-9861(89) 90506-7.
- [22] N. Glavas, S. Ahmad, P.D. Bragg, T. Olausson, J. Rydstrom, Identification of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-reactive glutamic and aspartic acid residues in Escherichia coli transhydrogenase and the exchange of these by site-specific mutagenesis, J. Biol. Chem. 268 (1993) 14125–14130.
 [23] E.A. Kean, M. Gutman, T.P. Singer, Studies on the respiratory chain-linked
- [23] E.A. Kean, M. Gutman, T.P. Singer, Studies on the respiratory chain-linked nicotinamide adenine dinucleotie dehydrogenase, J. Biol. Chem. 246 (1971) 2346–2353.
- [24] E.A. Kean, M. Gutman, T.P. Singer, Rhein, a selective inhibitor of the DPNH-flavin step in mitochondrial electron transport, Biochem. Biophys. Res. Commun. 40 (1970) 1507–1513.
- [25] J. Moyle, P. Mitchell, The proton-translocating nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate) transhydrogenase of rat liver mitochondria, Biochem. J. 132 (1973) 571–585, https://doi.org/10.1042/bj1320571.
- [26] J.D. McGarry, N.F. Brown, The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis, Eur. J. Biochem. 244 (1997) 1–14.
- [27] J. Rydström, Site-specific inhibitors of mitochondrial nicotinamide-nucleotide transhydrogenase, Eur. J. Biochem. 31 (1972) 496–504, https://doi.org/10.1111/ j.1432-1033.1972.tb02557.x.
- [28] J. Zhang, X. Hu, A.M. Osman, J. Rydström, Effects of metal ions on the substratespecificity and activity of proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase from Escherichia coli, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1319 (1997) 331–339, https://doi.org/10.1016/S0005-2728(96)00171-5.
- [29] W.M. Anderson, R.R. Fisher, Purification and partial characterization of bovine heart mitochondrial pyridine dinucleotide transhydrogenase, Arch. Biochem. Biophys. 187 (1978) 180–190, https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90021-8.
- [30] I. Dogar, S. Dixon, R. Gill, A. Young, S. Mallay, C. Oldford, R.J. Mailloux, C57BL/6J mice upregulate catalase to maintain the hydrogen peroxide buffering capacity of liver mitochondria, Free Radic. Biol. Med. 146 (2019) 59–69, https://doi.org/ 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.409.
- [31] J.A. Ronchi, T.R. Figueira, F.G. Ravagnani, H.C.F. Oliveira, A.E. Vercesi, R. F. Castilho, E. Vercesi, R.F. Castilho, A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities, Free Radic. Biol. Med. 63 (2013) 446–456, https://doi.org/ 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.049.
- [32] P. Lopert, M. Patel, Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) links the substrate requirement in brain mitochondria for hydrogen peroxide removal to the thioredoxin/peroxiredoxin (Trx/Prx) system, J. Biol. Chem. 289 (2014) 15611–15620, https://doi.org/10.1074/jbc.M113.533653.
- [33] J.A. Ronchi, A. Francisco, L.A.C. Passos, T.R. Figueira, R.F. Castilho, The contribution of nicotinamide nucleotide transhydrogenase to peroxide detoxification is dependent on the respiratory state and counterbalanced by other

sources of NADPH in liver mitochondria, J. Biol. Chem. 291 (2016) 20173–20187, https://doi.org/10.1074/jbc.M116.730473.

- [34] A. Francisco, J.A. Ronchi, C.D.C. Navarro, T.R. Figueira, R.F. Castilho, Nicotinamide nucleotide transhydrogenase is required for brain mitochondrial redox balance under hampered energy substrate metabolism and high-fat diet, J. Neurochem. 147 (2018) 663–677, https://doi.org/10.1111/jnc.14602.
- [35] J. Rydstrom, Assay of nicotinamide nucleotide transhydrogenases in mammalian, bacterial, and reconstituted systems, Methods Enzymol. LV (1979) 261–275.
- [36] C. Diggle, T. Bizouarn, N.P.J. Cotton, J.B. Jackson, N.P.J. Cotton, J.B. Jackson, Properties of the purified, recombinant, NADP(H)-Binding domain III of the proton-translocating nicotinamide nucleotide transhydrogenase from rhodospirillum rubrum, Eur. J. Biochem. 241 (1996) 162–170, https://doi.org/ 10.1111/j.1432-1033.1996.0162t.x.
- [37] J. Meuller, J. Zhang, C. Hou, P.D. Bragg, J. Rydström, Properties of a cysteine-free proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase, Biochem. J. 324 (1997) 681–687, https://doi.org/10.1042/bj3240681.
- [38] M. Mecha, P.M. Iñigo, L. Mestre, M. Hernangómez, J. Borrel, C. Guaza, An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: a beginners approach, Protoc. Exch. (2011) 1–18, https://doi.org/10.1038/protex.2011.218.
- [39] S. Schildge, C. Bohrer, K. Beck, C. Schachtrup, Isolation and culture of mouse cortical astrocytes, JoVE (2013) 1–7, https://doi.org/10.3791/50079.
- [40] Y. Liu, D.A. Peterson, H. Kimura, D. Schubert, Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction, J. Neurochem. 69 (1997) 581–593, https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x.
- [41] J.S. Ruas, E.S. Siqueira-Santos, E. Rodrigues-Silva, R.F. Castilho, High glycolytic activity of tumor cells leads to underestimation of electron transport system capacity when mitochondrial ATP synthase is inhibited, Sci. Rep. 8 (2018) 1–17, https://doi.org/10.1038/s41598-018-35679-8.
- [42] B. Chance, G.R. Williams, Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics and oxygen utilization, J. Biol. Chem. 217 (1955) 429–438.
- [43] M.D. Brand, D.G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells, Biochem. J. 435 (2011) 297–312, https://doi.org/10.1042/BJ20110162.
- [44] H.R. Ellis, L.B. Poole, Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase, Biochemistry 36 (1997) 15013–15018, https://doi.org/10.1021/ bi972191x.
- [45] K. Nitta, S.C. Bratcher, M.J. Kronman, Anomalous reaction of 4-chloro-7-nitrobenzofurazan with thiol compounds, Biochem. J. 177 (1979) 385–392, https://doi. org/10.1042/bj1770385.
- [46] G.L. Orriss, A.G.W. Leslie, K. Braig, J.E. Walker, Bovine F1-ATPase covalently inhibited with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: the structure provides further support for a rotary catalytic mechanism, Structure 6 (1998) 831–837, https://doi. org/10.1016/S0969-2126(98)00085-9.
- [47] S. Hong, P.L. Pedersen, ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human Health, disease, and other scientific areas, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72 (2008) 590–641, https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-08.
- [48] C. Hunke, V.S. Tadwal, M.S.S. Manimekalai, M. Roessle, G. Grüber, The effect of NBD-Cl in nucleotide-binding of the major subunit α and B of the motor proteins F1FO ATP synthase and A 1AO ATP synthase, J. Bioenerg. Biomembr. 42 (2010) 1–10, https://doi.org/10.1007/s10863-009-9266-y.
- [49] S. Raheem, A. Steiner, Functional importance of α Asp-350 in the catalytic sites of Escherichia coli, Arch. Biochem. Biophys. 672 (2019), 108050, https://doi.org/ 10.1016/j.abb.2019.07.015.
- [50] R. Sutton, S.J. Ferguson, The nature of the reaction of an essential tyrosine residue of bovine heart mitochondrial ATPase with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan and related compounds, Eur. J. Biochem. 142 (1984) 387–392, https://doi.org/ 10.1111/i.1432-1033.1984.tb08299.x.
- [51] I.A. Kozlov, Y.M. Milgrom, L.A. Saburova, S.A. Yu, The interaction of mitochondrial transhydrogenase with derivatives of coenzyme A, Eur. J. Biochem. 145 (1984) 413–416, https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08569.x.
- [52] E.I. Mileykovskaya, A.N. Abuladze, S.S. Kormer, D.N. Ostrovsky, Some pecularities of functioning of H + -ATPase from the membranes of the anaerobic bacterium Lactobacillus casei, Eur. J. Biochem. 167 (1987) 367–370.
- [53] B. Cardey, S. Foley, M. Enescu, Mechanism of thiol oxidation by the superoxide radical, J. Phys. Chem. 111 (2007) 13046–13052, https://doi.org/10.1021/ jp0731102.
- [54] M. Ahnoff, I. Grundevik, A. Arfwidsson, J. Fonselius, B.A. Persson, Derivatization with 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan for liquid chromatographic determination of hydroxyproline in collagen hydrolysate, Anal. Chem. 53 (1981) 485–489, https:// doi.org/10.1021/ac00226a024.
- [55] J. Kolarov, J. Houštěk, J. Kopecký, Š. Kužela, The binding of dicyclohexylcarbodiimide to uncoupling protein in brown adipose tissue mitochondria, FEBS Lett. 144 (1982) 6–10, https://doi.org/10.1016/0014-5793 (82)80557-7.
- [56] T. Yagi, Inhibition of NADH-Ubiquinone Reductase activity by N,N'dicyclohexylcarbodiimide and correlation of this inhibition with the occurrence of

energy-coupling site 1 in various organisms, Biochemistry 26 (1987) 2822–2828, https://doi.org/10.1021/bi00384a025.

- [57] L. Clejan, D.S. Beattie, Dicyloxhexylcarbodiimide blocks proton ejection and affects antimycin binding but not electron transport in complex III from yeast mitochondria, J. Biol. Chem. 258 (1983) 14271–14275.
- [58] V. de Pinto, M. Tommasino, R. Benz, F. Palmieri, The 35 kDa DCCD-binding protein from pig heart mitochondria is the mitochondrial porin, Biochim. Biophys. Acta 813 (1985) 230–242.
- [59] T. Iwasawa, P. Wash, C. Gibson, J. Rebek, Reaction of an introverted carboxylic acid with carbodiimide, Tetrahedron 63 (2007) 6506–6511, https://doi.org/ 10.1016/j.tet.2007.03.075.
- [60] M. Tommasino, R.A. Capaldi, Effect of dicyclohexylcarbodiimide on unisite and multisite catalytic activities of the adenosinetriphosphatase of Escherichia coli, Biochemistry 24 (1985) 3972–3976, https://doi.org/10.1021/bi00336a026.
- [61] C. Gibbons, M.G. Montgomery, A.G.W. Leslie, J.E. Walker, The structure of the central stalk in bovine F1-ATPase at 2.4 Å resolution, Nat. Struct. Biol. 7 (2000) 1055–1061, https://doi.org/10.1038/80981.
- [62] R.H. Fillingame, Identification of the dicyclohexylcarbodiimide reactive protein component of the adenosine 5' triphosphate energy transducing system of Escherichia coli, J. Bacteriol. 124 (1975) 870–883, https://doi.org/10.1128/ jb.124.2.870-883.1975.
- [63] N.J. Færgeman, J. Knudsen, Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling, Biochem. J. 323 (1997) 1–12, https://doi.org/10.1042/bj3230001.
- [64] G. Woldegiorgis, S.Y.K. Yousufzai, E. Shrago, Studies on the interaction of palmitoyl coenzyme A with the adenine nucleotide translocase, J. Biol. Chem. 257 (1982) 14783–14787.
- [65] H. Tominaga, H. Katoh, K. Odagiri, Y. Takeuchi, H. Kawashima, M. Saotome, T. Urushida, H. Satoh, H. Hayashi, Different effects of palmitoyl- L -carnitine and palmitoyl-CoA on mitochondrial function in rat ventricular myocytes, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 295 (2008) H105–H112, https://doi.org/10.1152/ ajpheart.01307.2007.
- [66] P. Bernardi, D. Penzo, L. Wojtczak, Mitochondrial energy dissipation by fatty acids: mechanims and implication for cell death, Vitam. Horm. 65 (2002) 97–126.
- [67] D. Penzo, C. Tagliapietra, R. Colonna, V. Petronilli, P. Bernardi, Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death, Biochim. Biophys. Acta 1555 (2002) 160–165.
- [68] C. Cecatto, A.U. Amaral, A.C. Roginski, R.F. Castilho, M. Wajner, Impairment of mitochondrial bioenergetics and permeability transition induction caused by major long-chain fatty acids accumulating in VLCAD deficiency in skeletal muscle as potential pathomechanisms of myopathy, Toxicol. Vitro 62 (2019), 104665, https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104665.
- [69] M.S. de Moraes, G. Guerreiro, A. Sitta, D. de Moura Coelho, V. Manfredini, M. Wajner, C.R. Vargas, Oxidative damage in mitochondrial fatty acids oxidation disorders patients and the in vitro effect of 1-carnitine on DNA damage induced by the accumulated metabolites, Arch. Biochem. Biophys. 679 (2020) 108206, https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108206.
- [70] E. Winkler, M. Klingenberg, Effect of fatty acids on H+ transport activity of the reconstituted uncoupling protein, J. Biol. Chem. 269 (1994) 2508–2515.
- [71] M.J. Kong, S.J. Han, J.I. Kim, J.W. Park, K.M. Park, Mitochondrial NADP+dependent isocitrate dehydrogenase deficiency increases cisplatin-induced oxidative damage in the kidney tubule cells, Cell Death Dis. 9 (2018) 488, https:// doi.org/10.1038/s41419-018-0537-6.
- [72] T. Zaobornyj, L.B. Valdez, Hearth mitochondrial nitric oxide synthase: a strategic enzyme in the regulation of cellular bioenergetics, in: G. Litwack (Ed.), Nitric Oxide, Elsevier, 2014, pp. 29–58.
- [73] A.E. Vercesi, The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of Ca2+ efflux from rat liver mitochondria, Arch. Biochem. Biophys. 252 (1987) 171–178.
- [74] B.V. Chernyak, P. Bernardi, The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites, Eur. J. Biochem. 238 (1996) 623–630, https://doi.org/ 10.1111/j.1432-1033.1996.0623w.x.
- [75] N.V. Zakharova, Kinetics of the transhydrogenase reaction catalyzed by mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I), Biochemistry (Mosc.) 67 (2002) 651–661, https://doi.org/10.1023/A:1016194120930.
- [76] F. Yin, H. Sancheti, E. Cadenas, Silencing of nicotinamide nucleotide transhydrogenase impairs cellular redox homeostasis and energy metabolism in PC12 cells, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1817 (2012), 401409, https://doi. org/10.1016/j.bbabio.2011.12.004.
- [77] A. Francisco, D.F. Engel, F. Rogério, A.F. de Bem, T.R. Figueira, R.F. Castilho, Mitochondrial NAD(P)+ transhydrogenase is unevenly distributed in different brain regions, and its loss causes depressive-like behavior and motor dysfunction in mice, Neuroscience 440 (2020) 210–229, https://doi.org/10.1016/j. neuroscience.2020.05.042.

SUPPLEMENTARY DATA

Undesirable Effects of Chemical Inhibitors of NAD(P)⁺ Transhydrogenase on Mitochondrial Respiratory Function

Rafaela Bicego, Annelise Francisco, Juliana S. Ruas, Edilene S. Siqueira-Santos, Roger F. Castilho



Fig. S1. Effect of 20-min preincubation with NBD-CI on forward and reverse modes of NNT activity and mitochondrial respiratory function. Mitochondrial suspensions were incubated in the absence (control) or in the presence of NBD-CI. Mitochondria were analyzed at 37 °C immediately (0 min) or after 20 min of preincubation at 22 °C with NBD-CI (5 μ M and 2 μ M for the forward and reverse reactions, respectively) or its solvent, ethanol. The effects of preincubation with NBD-CI on the NNT forward reaction (**A**), the NNT reverse reaction (**B**), and respiratory function (**C**) were assessed. *Significantly different from the respective control, p < 0.001; **significantly different from the respective control, p < 0.001; #significantly different from the respective control, p < 0.001;

4.2 Capítulo II - Avaliação da capacidade mitocondrial de metabolização de t-BOOH na presença de NBD-CI

Considerando a contribuição da NNT para a produção de NADPH mitocondrial, espera-se que sua inibição acarrete uma diminuição da capacidade mitocondrial de metabolizar peróxidos, como visto em estudos anteriores utilizando camundongos com e sem NNT funcional (14,22). Nesse sentido, decidimos avaliar se inibidores químicos da NNT teriam efeito sobre a metabolização de peróxido por mitocôndrias isoladas. Para isso escolhemos o NBD-CI já que, dentre os compostos testado no **Capítulo I**, esse apresentou a melhor relação entre inibição de NNT e menor inibição do controle respiratório mitocondrial.

Nesse experimento, o estado redox de NAD(P) foi acompanhado em espectrofluorímetro durante a metabolização de t-BOOH, um peróxido orgânico que é metabolizado exclusivamente por sistemas de detoxificação dependentes de NADPH (ie. GR/GPX e TR/PRX). Somente o NAD(P) no estado reduzido emite um forte sinal de fluorescência endógena, a qual é captado pelo equipamento no comprimento de onda de 450 nm, com excitação a 366 nm. Durante a metabolização do t-BOOH, esses sistemas de detoxificação utilizam o poder redutor no NADPH para se regenerar, enquanto este é oxidado, provocando uma queda na fluorescência (Figura 2A, B). Após a metabolização do t-BOOH ocorre o retorno da fluorescência para patamares similares ao inicial devido ao retorno do NAD(P) ao estado reduzido. A adição do protonóforo FCCP ao fim do traçado provoca a oxidação de todo o NADP, permitindo visualizar a fração deste que ainda se encontrava reduzida.

Os resultados mostram que mesmo a menor concentração de NBD-CI testada ocasionou diminuição significativa do tempo de metabolização de t-BOOH em relação às mitocôndrias *Nnt*^{+/+} em condições controle (**Figura 2A, C**). Além disso, o aumento do tempo de metabolização de t-BOOH foi diretamente proporcional às concentrações de NBD-CI testadas (**Figura 2C**) e portando relacionada a diminuição na capacidade mitocondrial de metabolizar t-BOOH (**Figura 2D**). Foram utilizadas concentrações de NBD-CI até 5 µM porque nesta concentração já ocorre um efeito de aproximadamente 50% de inibição do controle respiratório, como mostrado no **Capítulo I**.





Notadamente, o tempo de metabolização de t-BOOH na presença de NBD ainda é menor que o tempo de metabolização de t-BOOH observado em mitocôndrias sem NNT funcional (*Nnt^{/-}*) (**Figura 2A** *vs.* **2B** e **Figura 2D**), indicando que na presença de NBD-CI ainda há uma atividade residual de NNT que contribui para a metabolização de peróxidos. Além disso, parte do efeito observado na presença de NBD-CI se deve a inibição da respiração mitocondrial, já que vemos que esse traçado já parte de um ponto onde o NAD(P) está mais oxidado. Desta forma, o NBD-CI diminui parcialmente a capacidade de metabolizar t-BOOH em mitocôndrias isoladas, o que pode ser devido a inibição da NNT, mas também devido a efeitos tóxicos e inibitórios sobre outros componentes mitocondriais.

5. DISCUSSÃO

O uso de compostos químicos capazes de inibir a atividade de NNT foi uma das primeiras abordagens experimentais empregadas para se estudar as funções e mecanismos dessa proteina. Diversos compostos descritos como inibidores da NNT, dentre os quais o DCC, NBD-CI, palmitoil-CoA e rhein, foram utilizados mais frequentemente (ver **Tabela I**). Apesar disso, esses compostos não foram sistematicamente testados quanto à seletividade ou validados para uso em estudos funcionais. Nesse sentido, avaliamos no presente trabalho a eficácia desses compostos químicos quanto à inibição da atividade de NNT, efeitos na função respiratória mitocondrial e viabilidade celular.

No Capítulo I testamos os compostos DCC, NBD-CI, palmitoil-CoA e rhein como inibidores na NNT, avaliando seus efeitos sobre a reação direta e reversa da NNT, bem como sobre a respiração mitocondrial. Os dados obtidos mostram que o composto DCC prejudicou a respiração mitocondrial de forma expressiva em concentrações ao menos uma ordem de magnitude inferiores àquelas necessárias para inibir de forma significativa a atividade de NNT. Os efeitos de DCC na respiração mitocondrial se caracterizaram por inibição do estímulo da respiração por ADP e aumento da respiração não-fosforilante. O DCC é conhecido por reagir com grupos carboxila (86), sendo que resíduos de glutamato e aspartato são os locais de ligação e modificação estrutural por DCC em proteínas, e portanto, estariam relacionados à inibição da NNT e outras enzimas por DCC. É proposto que o DCC iniba a NNT alostericamente competindo pelo sítio de ligação de NAD(H), inibindo assim a atividade catalítica e translocação de prótons. Por meio de marcação radioativa, foi demonstrado que o DCC reage fortemente com resíduos de glutamato que se encontram em uma região próxima ao sítio de ligação de NAD(H) (62). Este composto também pode se ligar à região Fo da ATP sintase, inibindo a translocação de prótons (87). Sendo assim, não é inesperado, que o DCC tenha forte efeito inibitório sobre a função respiratória mitocondrial e seja portanto pouco seletivo para a NNT.

Dentre os compostos testados, o palmitoil-CoA é o mais comumente utilizado como inibidor da NNT em estudos funcionais. Apesar disso, o palmitoil-CoA não apresentou uma boa relação entre inibição de NNT e controle respiratório. O palmitoil-coA pode ser naturalmente encontrado no citosol e na matriz mitocondrial (87), já que ele é um subproduto do metabolismo de ácidos graxos. Ácidos graxos, no entanto, podem interagir com membranas e componentes mitocondriais, e afetar a função respiratória mitocondrial (88–92). O palmitoil-CoA é descrito na literatura como um potente inibidor da NNT, com efeito competitivo em relação ao NADP(H) devido a uma interação entre a porção de ácidos graxos do palmitoil-CoA e uma região hidrofóbica próxima ou no sítio de ligação de NADP(H) (67). No entanto, os resultados apresentados no **Capítulo I** sugerem que o palmitoil-CoA é pouco seletivo para a NNT, já que inibe significativamente a respiração mitocondrial estimulada por ADP em concentrações uma ordem de magnitude inferiores às que causaram inibição parcial das atividades direta e reversa da NNT.

É importante ressaltar que o palmitoil-CoA não é capaz de passar livremente pela membrana mitocondrial interna, dependendo da atividade da carnitina acetil transferase para ser transportado. Tendo isso em vista, testamos também o palmitoil-CoA em formulações que propiciariam sua passagem pelas membranas mitocondriais (i.e. palmitoil-CoA + carnitina e palmitoil-L-carnitina) (77). Ainda assim, não houve melhora na inibição da atividade de NNT, nem menor efeito sobre o consumo de oxigênio mitocondrial, de forma que a atuação dos compostos palmitoil-CoA + carnitina e palmitoil-CoA + carnitina e palmitoil-CoA + carnitina que a atuação dos compostos palmitoil-CoA + carnitina e palmitoil-L-carnitina como inibidores de NNT foi similar ou pior do que o palmitoil-CoA sozinho.

O rhein também apresentou um efeito pequeno na inibição da atividade da NNT, porém ocasionou um comprometimento significativo da função respiratória mitocondrial. É proposto que o rhein atue como inibidor competitivo de várias enzimas dependentes de NAD (70,71,84), nas quais atuaria entre o substrato e a flavina, competindo com relação ao NAD⁺ e ao NADH (70,84). No caso da NNT, o efeito inibitório causado pelo rhein não seria sítio-específico (67) e variaria de acordo com as concentrações de NAD e NADP (70,71). Essas observações justificam a baixa especificidade do rhein como inibidor de NNT.

Dentre os compostos testados, o NBD-CI foi aquele que, comparativamente, apresentou o melhor desempenho como inibidor de NNT, por inibir a atividade dessa enzima com o menor prejuízo à respiração mitocondrial (ver **Figura 8** do **Capítulo I**). O NBD-CI foi empregado como inibidor do NNT em trabalhos recentes (17,18,66), sendo que a inibição da NNT ocorreria devido a interação do NBD-CI com cisteínas e lisinas perto do sitio de ligação de NADP (64,65).

Diante dos resultados favoráveis obtidos em medidas de atividade de NNT

e respiração mitocondrial na presença de NBD-CI, foram feitos testes adicionais com esse composto. Em estudos da literatura, amostras de proteína ou mitocôndrias foram pré-incubadas com NBC-CI com o intuito de potencializar seu efeito inibitório tanto sobre a NNT quanto sobre a ATP sintase (64,65,93–95). No entanto, em nossas condições experimentais, não foi observado aumento da inibição da atividade de NNT por NBD-CI após 20 minutos de pré-incubação, enquanto ocorreu inibição significativa do controle respiratório mesmo em condições controle (**Capítulo I, Figura S1**). Provavelmente, a piora da função mitocondrial mesmo na condição controle de pré-incubação se deve a modificações estruturais em grupos funcionais de proteínas que ocorrem ao longo do tempo (*e.g.,* oxidação de grupos sulfidrila) (96), os quais são rapidamente modificações pela pré-incubação com esse composto.

O NBD-CI também foi testado quanto a sua toxidade em cultura primária de astrócitos sem NNT funcional. Os astrócitos são células gliais abundantes no sistema nervoso central (99,100). Além de estas células apresentarem uma proliferação rápida, trata-se de uma cultura celular primária de fácil obtenção e manutenção. Esses astrócitos foram obtidos a partir do córtex cerebral de camundongos neonatos portando a mutação espontânea no gene *Nnt* presente em camundongos C57BL/6J (*Nnt*^{C57BL/6J}), que resulta na ausência de expressão da proteína NNT madura nesses animais (11,53,83). O uso de astrócitos sem NNT funcional assegurou que os efeitos do NBD-CI sobre essas células seriam derivados de efeitos tóxicos do NBD-CI e não da inibição da NNT (27,101).

A exposição desses astrócitos às diferentes concentrações de NBD-CI testadas resultou em redução da proliferação e viabilidade celular. Essas observações foram feitas por meio de avaliação morfológica dos astrócitos, onde a presença de NBD-CI ocasionou diminuição do tamanho e arredondamento celular, mudanças morfológicas que sinalizam apoptose celular (102,103). Também foram feitos ensaios de viabilidade celular baseados na redução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium) a cristais de formazan e nas dosagens de concentrações de ATP, nos quais a presença do composto NBD-CI acarretou piora significativa da viabilidade (**Capítulo 1, Figura 9**). Dessa forma, nossos resultados mostraram que o composto NBD-CI foi tóxico para a cultura de astrócitos mesmo em concentrações baixas, que causaram apenas uma inibição parcial da atividade da NNT.

Para abordar o efeito de NBD-CI sobre mitocôndrias intactas em um contexto funcional, realizamos o ensaio de avaliação do estado redox de NAD(P) mitocondrial. Em nossos experimentos, vimos que o composto NBD-CI afeta a capacidade mitocondrial de metabolização de peróxido, mas o tempo de metabolização de t-BOOH na presença de NBD-CI foi maior que o tempo de metabolização de t-BOOH observado em mitocôndrias Nnt^{/-}, indicando que na presença de NBD ainda há uma atividade residual de NNT que contribui para a metabolização de peróxidos. De forma geral, os resultados obtidos nos experimentos de metabolização de t-BOOH podem ser parcialmente explicados por uma inibição da atividade da NNT, que reduziria o suprimento de NADPH, diminuindo a taxa de metabolização de peróxido. No entanto, a concentração máxima de NBD-CI (5 µM) testada nesse experimento também ocasionou prejuízo importante na função respiratória mitocondrial. Sendo assim, ao menos em parte, os efeitos observados neste ensaio são provenientes de um efeito nocivo sobre a cadeia respiratória mitocondrial, diminuindo o consumo de oxigênio mitocondrial e consequentemente a produção de NADH. Esse efeito pode ser evidenciado nos ensaios de avaliação do estado redox de NAD(P) mitocondrial, tendo em vista que os traçados realizados na presença NBD-CI já se iniciam a partir de uma situação em que o NAD(P)H encontrase mais oxidado, guando comparado a mitocôndrias que não tiveram tratamento com o composto (Capítulo II, Figura 2).

Nesse sentido, apesar de nos testes iniciais o NBD-CI ter apresentado o melhor desempenho entre os compostos avaliados em relação à inibição da NNT com menor comprometimento da função respiratória mitocondrial, os resultados aqui apresentados não validam a utilização desse inibidor em estudos funcionais com mitocôndrias ou células intactas. Os efeitos inespecíficos do NBD-CI podem estar relacionados a interações com grupamentos sulfidrilas, hidroxila amino e fenólicos, os quais estão presentes em diversas proteínas e estruturas celulares (98,104). Assim, interações do NBD-CI com outras proteínas mitocondriais, além da NNT, podem gerar um efeito tóxico, influenciando tanto na proliferação e viabilidade celular, quanto na diminuição da capacidade de metabolização de peróxidos (64,65). Esses resultados também evidenciam a necessidade de validação de efeitos inespecíficos mitocondriais e extra mitocondriais de compostos utilizados como inibidores da NNT.

De forma geral, os resultados apresentados nesta dissertação mostraram

que inibidores químicos da NNT comumente utilizados na literatura são, na verdade, pouco seletivos para inibir essa proteína, já que eles podem comprometer a função respiratória mitocondrial em concentrações capazes de inibir apenas parcialmente a atividade da NNT. É importante destacar que a expressão e, consequentemente, atividade de NNT pode ser inibida por meio de ferramentas genéticas (*eg.* RNAi, shRNA e CRISPR-Cas9), no entanto esses modelos podem apresentar desvantagens, como aumentos compensatórios em outras fontes de NADPH mitocondriais, sendo que em alguns contextos experimentais o uso dessas ferramentas é inviável. Nesse sentido, existe a necessidade de desenvolver inibidores químicos mais seletivos para a NNT, pois estes poderão contribuir de forma significativa para uma maior compreensão do papel fisiológico e fisiopatológico da NNT.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Os inibidores químicos da NNT testados no presente trabalho (NBD-CI, DCC, palmitoil-CoA, palmitoil-L-carnitina e rhein) comprometeram a função respiratória mitocondrial em concentrações capazes de inibir apenas parcialmente a atividade da NNT.
- O NBD-CI foi o inibidor de NNT que, comparativamente, apresentou melhor desempenho. Em concentrações que resultaram em uma inibição parcial da atividade da NNT, o NBD-CI prejudicou pouco a função respiratória mitocondrial.
- Mesmo sendo um inibidor promissor de NNT, o NBD-Cl foi tóxico para astrócitos *Nnt^{/-}* causando redução significativa na viabilidade e proliferação celular.
- O NBD-Cl inibiu apenas parcialmente o suprimento de NADPH para a metabolização de peróxido exógeno por mitocôndrias isoladas. Sendo que, mesmo na ausência de peróxido exógeno, o NAD(P)H se mostrou mais oxidado na presença da NBD-Cl.
- O uso de qualquer composto químico proposto como inibidor da NNT, deve ser evitado ou feito somente após validação de seus efeitos inespecíficos mitocondriais e extra-mitocondriais.

7. REFERÊNCIAS

1. Colowick SP, Kaplan NO, Neufeld EF, Ciotti MM. Pyridine nucleotide transhydrogenase. I. Indirect evidence for the reaction and purification of the enzyme. J Biol Chem. 1952;195(1):95–105.

2. Rydström J, Hoek JB, Ernster L. Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenases. In: Boyer PD, editor. The enzymes. Academic Press, New York.; 1976. p. 51–88.

3. Kaplan NO, Colowick SP, Neufeld EF. Pyridine nucleotide transhydrogenase. III. Animal tissue transhydrogenases. J Biol Chem. 1953/11/01. 1953 Nov;205(1):1–15.

4. Rydström J. Energy-linked nicotinamide nucleotide transhydrogenases. Biochim Biophys Acta. 1977;463 (2):155–84.

5. Earle SR, Fisher RR, O'Neal SG. Chemical Modification of Mitochondrial Transhydrogenase: Evidence for Two Classes of Sulfhydryl Groups. Biochemistry. 1978;17(22):4683–90.

6. Hoek JB, Rydstrom J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. Biochem J [Internet]. 1988 Aug 15 [cited 2018 Oct 3];254(1):1–10. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1135030/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1135030/pdf/biochemj00225-0011.pdf

7. Kampjut D, Sazanov LA. Structure and mechanism of mitochondrial proton-translocating transhydrogenase. Nature. 2019;573(7773):291–5.

8. Meimaridou E, Kowalczyk J, Guasti L, Hughes CR, Wagner F, Frommolt P, et al. Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. Nat Genet [Internet]. 2012/05/29. 2012;44(7):740–2. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ng.2299

9. Roucher-Boulez F, Mallet-Motak D, Samara-Boustani D, Jilani H, Ladjouze A, Souchon PF, et al. NNT mutations: A cause of primary adrenal insufficiency, oxidative stress and extra-adrenal defects. Eur J Endocrinol. 2016;175:73–84.

10. Fujisawa Y, Napoli E, Wong S, Song G, Yamaguchi R, Matsui T, et al. Impact of a novel homozygous mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase on mitochondrial DNA integrity in a case of familial glucocorticoid deficiency. BBA Clin [Internet]. 2015/08/27. 2015;3:70–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Cita tion&list_uids=26309815

11. Francisco A, Engel DF, Rogério F, de Bem AF, Figueira TR, Castilho RF. Mitochondrial NAD(P)+ transhydrogenase is unevenly distributed in different brain regions, and its loss causes depressive-like behavior and motor dysfunction in mice. Neuroscience. 2020;440:210–29.

12. Rydström J. Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease.

Biochim Biophys Acta - Bioenerg. 2006;1757(5-6):721-6.

13. Pedersen A, Karlsson GB, Rydström J. Proton-translocating transhydrogenase: An update of unsolved and controversial issues. J Bioenerg Biomembr. 2008;40(5):463–73.

14. Ronchi JA, Francisco A, Passos LAC, Figueira TR, Castilho RF. The contribution of nicotinamide nucleotide transhydrogenase to peroxide detoxification is dependent on the respiratory state and counterbalanced by other sources of NADPH in liver mitochondria. J Biol Chem. 2016;291(38):20173–87.

15. Ronchi JA, Figueira TR, Ravagnani FG, Oliveira HCF, Vercesi AE, Castilho RF, et al. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. Free Radic Biol Med. 2013/06/12. 2013;63:446–56.

16. Santos LRB, Muller C, Souza AH De, Takahashi HK, Spégel P, Sweet IR, et al. NNT reverse mode of operation mediates glucose control of mitochondrial NADPH and glutathione redox state in mouse pancreatic b -cells. Mol Metab. 2017;6(6):535–47.

17. Nickel AG, Von Hardenberg A, Hohl M, Löffler JR, Kohlhaas M, Becker J, et al. Reversal of mitochondrial transhydrogenase causes oxidative stress in heart failure. Cell Metab. 2015;22(3):472–84.

18. Sheeran FL, Rydström J, Shakhparonov MI, Pestov NB, Pepe S. Diminished NADPH transhydrogenase activity and mitochondrial redox regulation in human failing myocardium. Biochim Biophys Acta - Bioenerg [Internet]. 2010;1797(6–7):1138–48. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabio.2010.04.002

19. Metherell LA, Guerra-Assunção JA, Sternberg MJ, David A. Threedimensional model of human nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) and sequence-structure analysis of its disease-causing variations. Hum Mutat. 2016;37(10):1074–84.

20. Leung JH, Schurig-Briccio L a, Yamaguchi M, Moeller A, Speir J a, Gennis RB, et al. Division of labor in transhydrogenase by alternating proton translocation and hydride transfer. Science (80-). 2015;347(6218):178–81.

21. Yin F, Sancheti H, Cadenas E. Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways. Antioxidants Redox Signal. 2012;17(12):1714–27.

22. Francisco A, Ronchi JA, Navarro CDC, Figueira TR, Castilho RF. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase is required for brain mitochondrial redox balance under hampered energy substrate metabolism and high-fat diet. J Neurochem. 2018;147(5):663–77.

23. Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A, Fischer E. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of Escherichia coli. J Biol Chem. 2004;279(8):6613–9.

24. Vogel R, Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R. The regeneration of reduced glutathione in rat forebrain mitochondria identifies metabolic pathways providing the NADPH required. Neurosci Lett. 1999;275(2):97–100.

25. Smolková K, Ježek P. The role of mitochondrial NADPH-dependent isocitrate dehydrogenase in cancer cells. Int J Cell Biol. 2012;2012:12.

26. Gameiro PA, Laviolette LA, Kelleher JK, Iliopoulos O, Stephanopoulos G. Cofactor balance by nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) coordinates reductive carboxylation and glucose catabolism in the tricarboxylic acid (TCA) cycle. J Biol Chem. 2013;288(18):12967–77.

27. Maechler P, Carobbio S, Rubi B. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(5–6):696–709.

28. Nissen JD, Lykke K, Bryk J, Stridh MH, Zaganas I, Skytt DM, et al. Expression of the human isoform of glutamate dehydrogenase, hGDH2, augments TCA cycle capacity and oxidative metabolism of glutamate during glucose deprivation in astrocytes. Glia. 2017;65(3):474–88.

29. Mastorodemos V, Zaganas I, Spanaki C, Bessa M, Plaitakis A. Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands. J Neurosci Res. 2005;79(1–2):65–73.

30. Li C, Chen P, Palladino A, Narayan S, Russell LK, Sayed S, et al. Mechanism of hyperinsulinism in short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency involves activation of glutamate dehydrogenase. J Biol Chem. 2010;285(41):31806–18.

31. Carobbio S, Frigerio F, Rubi B, Vetterli L, Bloksgaard M, Gjinovci A, et al. Deletion of glutamate dehydrogenase in β -cells abolishes part of the insulin secretory response not required for glucose homeostasis. J Biol Chem. 2009;284(2):921–9.

32. Wong H-S, Dighe PA, Mezera V, Monternier P-A, Brand MD. Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions. J Biol Chem [Internet]. 2017 Oct 13 [cited 2018 May 31];292(41):16804–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28842493

33. Francisco A, Castilho RF. Radicais livres e estresse oxidativo. In: Carvalho HF, Recco-Pimentel SM, editors. A célula. 4th ed. Barueri: Manole; 2019. p. 583–94.

34. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. Annu Rev Biochem. 2017;86:715–48.

35. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med [Internet]. 2009;47(4):333–43. http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004

36. Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JCB, Kowaltowski AJ, et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: From molecular mechanisms to human health. Antioxidants Redox Signal. 2013 Jun 1;18(16):2029–74.

37. Jones DP, Sies H. The Redox Code. Vol. 23, Antioxidants and Redox Signaling. Mary Ann Liebert, Inc.; 2015. p. 734–46.

38. Bowler C VMM and ID. Superoxide-dismutase and stress tolerance. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 1992;43:83–116.

39. Fridovich I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. Ann Rev Biochem. 1995;64:97–112.

40. Dogar I, Dixon S, Gill R, Young A, Mallay S, Oldford C, et al. C57BL/6J mice upregulate catalase to maintain the hydrogen peroxide buffering capacity of liver mitochondria. Free Radic Biol Med [Internet]. 2019;146(October 2019):59–69. Available from: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.409

41. Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, et al. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. J Biol Chem. 2007;282(33):24407–15.

42. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. Detection of catalase in rat heart mitochondria. J Biol Chem. 1991;266(32):22028–34.

43. Munro D, Banh S, Sotiri E, Tamanna N, Treberg JR. The thioredoxin and glutathione-dependent H2O2 consumption pathways in muscle mitochondria: Involvement in H2O2 metabolism and consequence to H2O2 efflux assays. Free Radic Biol Med [Internet]. 2016;96:334–46. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.014

44. Phung CD, Ezieme JA, Turrens JF. Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. Vol. 315, Archives of Biochemistry and Biophysics. 1994. p. 479–82.

45. Rigobello MP, Callegaro MT, Barzon E, Benetti M, Bindoli A. Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the redox regulation of membrane permeability. Free Radic Biol Med. 1998;24(2):370–6.

46. Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. J Biol Chem. 1994;269(44):27670–8.

47. Drechsel DA, Patel M. Respiration-dependent H2O2 removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system. J Biol Chem. 2010;285(36):27850–8.

48. Arkblad EL, Tuck S, Pestov NB, Dmitriev RI, Kostina MB, Stenvall J, et al. A Caenorhabditis elegans mutant lacking functional nicotinamide nucleotide transhydrogenase displays increased sensitivity to oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2005;38(11):1518–25.

49. Freeman HC, Hugill A, Dear NT, Ashcroft FM, Cox RD. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: A new quantitive trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. Diabetes. 2006;55(7):2153–6.

50. Yin F, Sancheti H, Cadenas E. Silencing of nicotinamide nucleotide transhydrogenase impairs cellular redox homeostasis and energy metabolism in PC12 cells. Biochim Biophys Acta - Bioenerg. 2012;1817(3):401–9.

51. Lopert P, Patel M. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) links the substrate requirement in brain mitochondria for hydrogen peroxide removal to the

thioredoxin/peroxiredoxin (Trx/Prx) system. J Biol Chem. 2014;289(22):15611-20.

52. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. Exp Anim. 2009;58(2):141–9.

53. Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. Diabetologia. 2005;48(4):675–86.

54. Navarro CDC, Figueira TR, Francisco A, Dal GA, Ronchi JA, Rovani JC, et al. Redox imbalance due to the loss of mitochondrial NAD(P)-transhydrogenase markedly aggravates high fat diet-induced fatty liver disease in mice. Free Radic Biol Med. 2017/10/02. 2017;113(1):190–202.

55. Salerno AG, Rentz T, Dorighello GG, Marques AC, Lorza-Gil E, Wanschel ACBA, et al. Lack of mitochondrial NADP(H)-transhydrogenase expression in macrophages exacerbates atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. Biochem J. 2019;476(24):3769–89.

56. Leskov I, Neville A, Shen X, Pardue S, Kevil CG, Granger DN, et al. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase activity impacts mitochondrial redox balance and the development of hypertension in mice. J Am Soc Hypertens. 2017;11(2):110–21.

57. Vozenilek AE, Vetkoetter M, Green JM, Shen X, Traylor JG, Klein RL, et al. Absence of Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase in C57BL/6J Mice Exacerbates Experimental Atherosclerosis. J Vasc Res. 2018;55(2):98–110.

58. Rao KNS, Shen X, Pardue S, Krzywanski DM. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) regulates mitochondrial ROS and endothelial dysfunction in response to angiotensin II. Redox Biol [Internet]. 2020;36:101650. Available from: https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101650

59. Vandock KP, Smith SL, Fioravanti CF. Midgut mitochondrial transhydrogenase in wandering stage larvae of the tobacco hornworm, Manduca sexta. Arch Insect Biochem Physiol. 2008;69(3):118–26.

60. Phelps DC, Hatefi Y. Inhibition of the mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase by dicyclohexylcarbodiimide and diethylpyrocarbonate. J Biol Chem. 1981;256(15):8217–21.

61. Clarke DM, Bragg PD. Purification and properties of reconstitutively active nicotinamide nucleotide transhydrogenase of Escherichia coli. Eur J Biochem. 1985;149(3):517–23.

62. Glavas N, Ahmad S, Bragg PD, Olausson T, Rydström J. Identification of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-reactive glutamic and aspartic acid residues in Escherichia coli transhydrogenase and the exchange of these by site-specific mutagenesis. J Biol Chem. 1993;268(19):14125–30.

63. Lê-Quôc D, Lê-Quôc K. Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation, and inner membrane permeability in rat liver mitochondria. Arch Biochem Biophys. 1989;273(2):466–78.

64. Persson B, Hartog AF, Rydström J, Berden JA. NBD-CI modification of essential residues in mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase from bovine heart. Biochim Biophys Acta (BBA)/Protein Struct Mol. 1988;953(C):241–8.

65. Bragg PD, Hou C. Effect of NBD chloride (4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) on the pyridine nucleotide transhydrogenase of Escherichia coli. Biochim Biophys Acta - Bioenerg. 1999;1413(3):159–71.

66. Aon MA, Cortassa S, Maack C, O'Rourke B. Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status. J Biol Chem. 2007;282(30):21889–900.

67. Rydström J. Site-specific inhibitors of mitochondrial nicotinamidenucleotide transhydrogenase. Eur J Biochem. 1972;31(3):496–504.

68. Anderson WM, Fisher RR. Purification and partial characterization of bovine heart mitochondrial pyridine dinucleotide transhydrogenase. Arch Biochem Biophys [Internet]. 1978 Apr 15 [cited 2018 Aug 16];187(1):180–90. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986178900218?via%3Dihub

69. Zhang J, Hu X, Osman AM, Rydström J. Effects of metal ions on the substrate-specificity and activity of proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase from Escherichia coli. Biochim Biophys Acta - Bioenerg [Internet]. 1997 Apr 11 [cited 2018 Aug 16];1319(2–3):331–9. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272896001715?via%3Dihub

70. Kean EA, Gutman M, Singer TP. Rhein, a selective inhibitor of the DPNHflavin step in mitochondrial electron transport. Biochem Biophys Res Commun. 1970;40(6):1507–13.

71. Kean EA, Gutman M, Singer TP. Studies on the respiratory chain-linked nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XXII. Rhein, a competitive inhibitor of the dehydrogenase. J Biol Chem. 1971 Apr;246(8):2346–53.

72. Moyle J, Mitchell P. The proton-translocating nicotinamide-adenine dinucleotide (phosphate) transhydrogenase of rat liver mitochondria. Biochem J. 1973;132(3):571–85.

73. Wefers H, Sies H. Hepatic low-level chemiluminescence during redox cycling of menadione and the menadione-glutathione conjugate: Relation to glutathione and NAD(P)H:quinone reductase (DT-diaphorase) activity. Arch Biochem Biophys. 1983;224(2):568–78.

74. Phelps DC, Hatefi Y. Mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase: Nonidentical modification by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide and n-(ethoxycarbonyl)-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline at the NAD(H) binding site. Arch Biochem Biophys. 1985;243(1):298–304.

75. Carrasquer G, Li M, Dinno MA. Effect of dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) on transport parameters in the frog cornea epithelium. J Membr Biol. 2000;174(2):97–103.

76. Borisenko GG, Kapralov AA, Tyurin VA, Maeda A, Stoyanovsky DA, Kagan VE. Molecular design of new inhibitors of peroxidase activity of cytochrome

c/cardiolipin complexes: Fluorescent oxadiazole-derivatized cardiolipin. Biochemistry. 2008;47(51):13699–710.

77. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. Eur J Biochem. 1997;244:1–14.

78. Rydström J, Panov AV, Paradies G, Ernster L. Inhibition of mitochondrial nicotinamide nucleotide transhydrogenase by CoA-thioesters of long-chain fatty acids. Biochem Biophys Res Commun. 1971;45(6):1389–97.

79. Halle-Smith SC, Murray AG, Selwyn MJ. Palmitoyl-CoA inhibits the mitochondrial inner membrane anion-conducting channel. FEBS Lett. 1988;236(1):155–8.

80. Moore KH, Dandurand DM, Kiechle FL. Fasting induced alterations in mitochondrial palmitoyl-coa metabolism may inhibit adipocyte pyruvate dehydrogenase activity. Int J Biochem. 1992;24(5):809–14.

81. Sheng X, Wang M, Lu M, Xi B, Sheng H, Zang YQ. Rhein ameliorates fatty liver disease through negative energy balance, hepatic lipogenic regulation, and immunomodulation in diet-induced obese mice. Am J Physiol - Endocrinol Metab. 2011;300(5):886–93.

82. Chen WH, Chen J, Shi YP. Anthraquinones and stilbenes from the roots and rhizomes of Rhubarb. J Asian Nat Prod Res. 2011;13(11):1036–41.

83. Huang Q, Lu G, Shen HM, Chung MCM, Choon NO. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. Med Res Rev. 2007;27(5):609–30.

84. Zakharova N V. Kinetics of the transhydrogenase reaction catalyzed by mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). Biochem. 2002;67(6):651–61.

85. Bellomo G, Martino A, Richelmi P, Moore GA, Jewell SA, Orrenius S. Pyridine-nucleotide oxidation, Ca2+ cycling and membrane damage during tert-butyl hydroperoxide metabolism by rat-liver mitochondria. Eur J Biochem. 1984;140(1):1–6.

86. Iwasawa T, Wash P, Gibson C, Rebek J. Reaction of an introverted carboxylic acid with carbodiimide. Tetrahedron. 2007;63(28):6506–11.

87. Fillingame RH. Identification of the dicyclohexylcarbodiimide reactive protein component of the adenosine 5' triphosphate energy transducing system of Escherichia coli. J Bacteriol. 1975;124(2):870–83.

88. Penzo D, Tagliapietra C, Colonna R, Petronilli V, Bernardi P. Effects of fatty acids on mitochondria: implications for cell death. Biochim Biophys Acta. 2002;1555:160–5.

89. Tominaga H, Katoh H, Odagiri K, Takeuchi Y, Kawashima H, Saotome M, et al. Different effects of palmitoyl-L-carnitine and palmitoyl-CoA on mitochondrial function in rat ventricular myocytes. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2008;295(1):105–12.

90. Cecatto C, Amaral AU, Roginski AC, Castilho RF, Wajner M. Impairment

of mitochondrial bioenergetics and permeability transition induction caused by major long-chain fatty acids accumulating in VLCAD deficiency in skeletal muscle as potential pathomechanisms of myopathy. Toxicol Vitr [Internet]. 2019;62(September 2019):104665. Available from: https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104665

91. Woldegiorgis G, Yousufzai SYK, Shrago E. Studies on the Interaction of Palmitoyl Coenzyme A with the Adenine Nucleotide Translocase. J Biol Chem. 1982;257(24):14783–7.

92. de Moraes MS, Guerreiro G, Sitta A, de Moura Coelho D, Manfredini V, Wajner M, et al. Oxidative damage in mitochondrial fatty acids oxidation disorders patients and the in vitro effect of I-carnitine on DNA damage induced by the accumulated metabolites. Arch Biochem Biophys [Internet]. 2020;679(November 2019):108206. Available from: https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108206

93. Sutton R, Ferguson SJ. The nature of the reaction of an essential tyrosine residue of bovine heart mitochondrial ATPase with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan and related compounds. Eur J Biochem. 1984;142(2):387–92.

94. Mileykovskaya EI, Abuladze AN, Kormer SS, Ostrovsky DN. Some pecularities of functioning of H + -ATPase from the membranes of the anaerobic bacterium Lactobacihs casei. Eur J Biochem. 1987;167:367–70.

95. Raheem S, Steiner A. Functional importance of α Asp-350 in the catalytic sites of Escherichia coli. Arch Biochem Biophys. 2019;672:108050.

96. Cardey B, Foley S, Enescu M. Mechanism of thiol oxidation by the superoxide radical. J Phys Chem A. 2007;111(50):13046–52.

97. Ahnoff M, Grundevik I, Arfwidsson A, Fonselius J, Persson BA. Derivatization with 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan for Liquid Chromatographic Determination of Hydroxyproline in Collagen Hydrolysate. Anal Chem. 1981;53(3):485–9.

98. Ellis HR, Poole LB. Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. Biochemistry. 1997;36(48):15013–8.

99. Minich T, Yokota S, Dringen R. Cytosolic and mitochondrial isoforms of NADP+-dependent isocitrate dehydrogenases are expressed in cultured rat neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglial cells. J Neurochem. 2003;86(3):605–14.

100. Jackson JG, Robinson MB. Regulation of mitochondrial dynamics in astrocytes: Mechanisms, consequences, and unknowns. Glia. 2018;66(6):1213–34.

101. Schildge S, Bohrer C, Beck K, Schachtrup C. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. J Vis Exp. 2013;(71):1–7.

102. Quintana DD, Garcia JA, Sarkar SN, Jun S, Engler-Chiurazzi EB, Russell AE, et al. Hypoxia-reoxygenation of primary astrocytes results in a redistribution of mitochondrial size and mitophagy. Mitochondrion. 2019;47(January 2017):244–55.

103. Freeman MR. Specification and morphogenesis of astrocytes. Science (80-). 2010;330(6005):774–8.

104. Nitta K, Bratcher SC, Kronman MJ. Anomalous reaction of 4-chloro-7nitrobenzofurazan with thiol compounds. Biochem J. 1979;177(2):385–92.

ANEXO - 8.1: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP)



CERTIFICADO

CEUA/UNICAM

Certificamos que a proposta intitulada <u>Avaliação Funcional de Inibidores Farmacológicos da</u> <u>Transidrogenase de Nucleotídeos de Nicotinamida</u>, registrada com o nº <u>4906-1/2018</u>, sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Roger Frigério Castilho e Rafaela Bicego</u>, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de <u>14 de junho de 2018</u>.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica				
Vigência do projeto:	01/08/2018-31/07/2020				
Vigência da autorização para manipulação animal:	01/08/2018-31/07/2020				
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib (ZFV, Hannover, Germany, 1987)				
No. de animais:	40				
Idade/Peso:	03 dias / 30g				
Sexo:	fêmeas				
Origem:	CEMIB/UNICAMP				
Biotério onde serão mantidos os animais:	Unidade Multidisciplinar de Experimentação Animal - UMEA FCM/UNICAMP				

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 14 de junho de 2018.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Presidente

MD

Fátima Alonso Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO – 8.2. Autorização de Copyright

O "Archives of Biochemistry and Biophysics" permite o uso de versão final do artigo em dissertação do autor conforme consta no fragmento do "Journal Author Copyright Policies" abaixo.

Personal use

Authors can use their articles, in full or in part, for a wide range of scholarly, non-commercial purposes as outlined below:

- Use by an author in the author's classroom teaching (including distribution of copies, paper or electronic)
- Distribution of copies (including through e-mail) to known research colleagues for their personal use (but not for Commercial Use)
- Inclusion in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- Use in a subsequent compilation of the author's works
- Extending the Article to book-length form
- Preparation of other derivative works (but not for Commercial Use)
- · Otherwise using or re-using portions or excerpts in other works

These rights apply for all Elsevier authors who publish their article as either a subscription article or an open access article. In all cases we require that all Elsevier authors always include a full acknowledgement and, if appropriate, a link to the final published version hosted on Science Direct.