

**LEANDRO ALMEIDA DA SILVA**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM N-CETILCISTEÍNA SOBRE  
DINÂMICA MITOCONDRIAL EM MODELO ANIMAL DE  
ISQUEMIA CRÔNICA DE MEMBROS INFERIORES**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade do  
Extremo Sul Catarinense para a  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

**CRICIÚMA  
2017**

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586e Silva, Leandro Almeida da.

Efeito do tratamento com N-acetilcisteína sobre dinâmica mitocondrial em modelo animal de isquemia crônica de membros inferiores / Leandro de Almeida da Silva ; orientador : Felipe Dal Pizzol. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.

54 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

1. N-acetilcisteína – Uso terapêutico. 2. Isquemia tecidual - Tratamento. 3. Trombose arterial. 4. Autofagia.  
I. Título.

CDD. 22<sup>a</sup> ed. 615.1

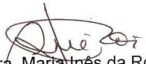


UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

---

#### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 275

Com início às 08h00 (oito horas) do dia vinte e quatro do mês de março de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Leandro Almeida da Silva**, sob a orientação do Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, intitulada **"Efeito do tratamento com n-acetilcisteína sobre dinâmica mitocondrial em modelo animal de isquemia crônica de membros inferiores"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado; Prof. Dr. Emílio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof. Dr. Daniel Pens Gelain (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 09h00 (nove horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Inês da Rosa Coordenadora do Programa. Criciúma, 24 (vinte e quatro) de março de 2017 (dois mil e dezessete).

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Inês da Rosa  
Coordenadora do PPGCS

  
Diana Ghisi Daniel  
Secretária



## **FOLHA INFORMATIVA**

Esta dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



Dedico este trabalho a minha família: Ritele, Gabriela e  
Henrique.





## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, minha gratidão, por ter me dado a oportunidade de retomar minha caminhada acadêmica.

Aos pós-doutorandos, doutorandos, mestrandos e bolsistas do Laboratório de Fisiopatologia, que foram grandes parceiros durante o período do mestrado.



## RESUMO

A morte tecidual decorrente das alterações isquêmicas é um processo complexo que envolve uma série de eventos celulares. A interrupção do fluxo sanguíneo compromete o suprimento de oxigênio, nutrientes e metabólitos necessários a manutenção fisiológica do tecido muscular.

Dentre as causas de isquemia tecidual destacamos a trombose arterial causada pela doença aterosclerótica, responsável por alterações isquêmicas cardíacas, renais, cerebrais e periféricas. A isquemia tecidual causada pela doença aterosclerótica possui grande incidência principalmente na população ocidental atual, sendo responsável por altas taxas de morbidade e de mortalidade.

Diante deste cenário, buscamos avaliar o papel do tratamento com N-acetilcisteína (NAC) em animais submetidos ao modelo de isquemia de membros inferior. Para avaliar o efeito de NAC, utilizou-se 21 ratos machos adultos, da linhagem *Wistar*, com peso variando entre 250-300 g, divididos em três grupos de 7 animais: (1) Sham, (2) Isquemia, (3) Isquemia tratada com NAC.

Os animais foram submetidos ao processo de indução de isquemia dos membros posteriores por meio da dupla eletrocoagulação das artérias ilíaca comum e femoral comum e após o procedimento receberam uma dose oral diária de NAC de 30 mg/kg por 30 dias. Ao final dos 30 dias o músculo solear foi retirado para as avaliações de consumo de oxigênio, marcadores de autofagia (ATG16, ATG3, Beclin, LC3 A/B, marcadores de mitofagia PINK e PARKIN, e marcadores de biogênese mitocondrial NRF-1, PGC-1 $\alpha$  e TFAM.

Nos animais submetidos ao tratamento com NAC, evidenciou-se redução significativa na atividade do PGC1  $\alpha$  e TFAM, marcadores de biogênese mitocondrial, assim como aumento do consumo de oxigênio, em hipóxia, de animais submetidos a isquemia crônica de membros inferiores, o marcador de autofagia beclina também mostrou-se reduzido em relação aos animais não tratados. Não houve alteração significativa na concentração dos marcadores de autofagia (LC3, ATG3 e ATG16), nos níveis de Pink e PARKIN – marcadores de mitofagia, assim como no marcador NRF1 de biogênese mitocondrial. A baixa concentração de consumo de oxigênio, em normóxia, em animais submetidos a isquemia crônica de membros inferiores não foi revertida pela NAC. Em conclusão, o tratamento com a NAC reverte o aumento do consumo de oxigênio em hipóxia, mas este efeito não parece ser secundário diretamente a modulação dos processos de autofagia, mitofagia ou biogênese mitocondrial.

**Palavras-chave:** Autofagia; Biogênese; Isquemia de membros; Mitochondrial; N-acetilcisteína.

## ABSTRACT

The tissue death resulting from ischemic changes is a complex process that involves a series of cell events. The interruption of the bloodstream compromise the oxygen supply, nutrients and metabolites needed for the physiological maintenance of muscle tissue. Among the causes of tissue ischemia we highlight arterial thrombosis caused by atherosclerotic disease, responsible for the cardiac, renal, cerebral and peripheral ischemic changes. The tissue ischemia caused by atherosclerotic disease has great incidence on the current *Western* population, being responsible for high rates of morbidity and mortality. Given the current situation, We sought to evaluate the role of N-acetylcysteine treatment in animals submitted to the lower members ischemia model. To evaluate the effect of Nac, 21 male Wistar rats weighing 250-300 g were used and they were divided into three groups of 7 animals: (1) Sham, (2) Ischemia, (3) NAC-treated ischemia. The animals were submitted to the process of ischemia induction of the hind limbs through the double electrocoagulation of the common iliac arteries and common femoral, then after the procedure they received a daily oral dose of 30 mg/kg of Nac for 30 days. At the end of the 30 days the solear muscle was taken for assessments of oxygen consumption, autophagy markers (ATG16, ATG3, Beclin, LC3 A/B, Markers of mitofagia PINK e PARKIN, and mitochondrial biogenesis markers NRF-1, PGC-1 $\alpha$  and TFAM. The animals submitted to the NAC treatment, there was a significant reduction in the activity of PGC1 $\alpha$  and TFAM, markers of mitochondrial biogenesis, as well as the increase in the oxygen consumption, in hypoxia, of animals submitted to chronic lower members ischemia, the autophagy beclina marker was also reduced in relation to untreated animals. There were no significant changes in the concentration of autophagy markers (LC3, ATG3 e ATG16 ), in the levels of PINK and PARKIN – mitophagy marker, as well as in the NRF1 of mitochondrial biogenesis marker. The low concentration of oxygen consumption, in normoxia, in animals submitted to chronic lower members ischemia was not reversed by NAC. In conclusion, the treatment with NAC reverses the increase of oxygen consumption in hypoxia, but this effect does not seem to be directly secondary to the modulation of the processes of autophagy, mitofagia or mitochondrial biogenesis.

**Keywords:** Autophagy; Biogenesis; Isquemia de membros; Mitochondrial N-acetylcysteine.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Adenosina difosfato  
ATG 16 - Gene/proteína associada a autofagia 16  
ATG 3 - Gene/proteína associada a autofagia 3  
ATP - Adenosina trifosfato  
CTE - Cadeia transportadora de elétrons  
DAOPC - Doença atesclerótica que compromete os membros inferiores  
EGTA - Etilenoglicol tetraacético  
GPx - Glutationaperoxidase  
GSH - Glutathione  
HEPES - Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-il]-etanossulfônico  
ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular 1  
IL6 - Interleucina 6  
IMI - Isquemia de membro inferior  
LC3 A/B - Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos  
LDL - Lipoproteína de baixa densidade  
MDA - Malondialdeído  
MOPS - Ácido 3-morfolinopropano-1 sulfônico  
TFAM - Fator de Transcrição Mitocondrial A  
NAC-N - acetilcisteína  
NRF-1- Fator Respiratório Nuclear 1  
PCR - Proteína C reativa  
PGC1  $\alpha$  - Cofator de transcrição gênica  
pH - Potencial Hidrogeniônico  
RNS - Espécies reativas de nitrogênio  
ROS - Espécies reativas de oxigênio  
SOD - Superóxido dismutase  
TASC II - Consenso inter-sociedade da doença arterial periférica  
VCAM-1 - Proteína de adesão de células vasculares 1  
VEGF - Fator de crescimento do endotélio





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 DEFINIÇÃO DE ISQUEMIA DE MEMBROS INFERIORES .....	19
1.2 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA DE MEMBROS INFERIORES .....	21
1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	22
1.4 AUTOFAGIA E BIOGÊNESE MITOCONDRIAL .....	22
1.5 N-ACETILCISTEÍNA - NAC .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 ANIMAIS .....	29
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL .....	29
3.3 INDUÇÃO DE ISQUEMIA DE MEMBRO INFERIOR .....	30
3.4 TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA .....	31
3.5 ANÁLISES .....	31
<b>3.5.1 Avaliação do Consumo de Oxigênio</b> .....	<b>31</b>
3.6 ANÁLISE DE MARCADORES DE AUTOFAGIA/MITOFAGIA POR WESTERN BLOTTING .....	32
3.7 ANÁLISE DE MARCADORES DE BIOGÊNESE MITOCONDRIAL POR PCR .....	32
<b>3.7.1 Extração de RNA Total</b> .....	<b>32</b>
<b>3.7.2 Determinação da pureza de RNA</b> .....	<b>33</b>
<b>3.7.3 Síntese do cDNA</b> .....	<b>33</b>
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>35</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>53</b>
<b>ANEXO A - Certificado</b> .....	<b>55</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEFINIÇÃO DE ISQUEMIA DE MEMBROS INFERIORES

A incidência da isquemia crítica de membros inferiores tem sido estimada entre 500 a 1000 milhão por ano na Europa e nos Estados Unidos (Becker e Riemekasten, 2012). E segundo Jensen e colaboradores se torna responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade na população do ocidente (Jensen et al., 2006).

A aterosclerose é a doença degenerativa mais comum no ser humano, estando relacionada a fatores genéticos, infecciosos e ambientais. A palavra provém do grego atheros (caldo espesso), oma (tumor) e scleros (endurecimento), significando alterações celulares com deposição de cálcio e colesterol formando áreas de espessamento na parede arterial. O termo ateroma foi sugerido por Von Haller (1775), e a denominação aterosclerose foi proposta por Marchand (1904), para caracterizar as lesões com degeneração gordurosa e proliferação de tecido conectivo (Maffei et al., 2002). A aterosclerose, doença vascular subjacente à maioria dos casos de infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares encefálicos, é a principal causa de morte nas sociedades ocidentais. Atualmente, sabe-se que a aterosclerose não é uma simples consequência degenerativa do envelhecimento, mas antes, uma doença inflamatória crônica que envolve uma inter-relação complexa de elementos celulares circulantes e as células da parede arterial (Ross, 1999).

A aterosclerose é uma doença progressiva caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e de elementos fibrosos nas grandes artérias. As lesões precoces da aterosclerose – as estrias gordas – são o resultado do acúmulo subendotelial de macrófagos enriquecidos em colesterol, designados por células esponjosas. Nos humanos, estas lesões são observáveis na aorta na primeira década de vida, nas artérias coronárias na segunda década, e nas artérias cerebrais na terceira ou quarta década de vida. Apesar das estrias gordas não serem clinicamente significativas são precursoras de lesões mais avançadas caracterizadas pelo acúmulo de detritos necróticos ricos em lipídeos e de células musculares lisas – as placas fibrosas. Estas placas podem tornar-se ainda mais complexas, devido por exemplo a calcificações, e aumentarem até limitarem a circulação sanguínea por formação de um trombo ou coágulo sanguíneo (Luisi, 2000). Segundo o TASC II (TransAtlantic InterSociety Consensus on the Management of Peripheral Arterial Disease) publicado em 2007 a prevalência da doença aterosclerótica que

compromete os membros inferiores (DAOPC), varia de 3 a 10% na população adulta, com um aumento para 15-20% em maiores de 70 anos (Norgren et al, 2007).

Nos membros inferiores, o processo aterosclerótico pode apresentar-se clinicamente de modo insidioso, através de claudicação intermitente para longas distâncias. Evolui para claudicação invalidante, e finalmente dor em repouso associada ou não a lesões tróficas, com risco de perda da extremidade (Maffei et al., 2002). A isquemia de membro inferior (IMI) é uma condição presente quando o paciente possui um quadro clínico de dor em repouso ou com a presença de lesões tróficas, sendo uma apresentação clínica com elevado risco de perda do membro afetado. Em países desenvolvidos, sua incidência está estimada entre 50 e 100 casos em 100 mil habitantes todos os anos. Dessa forma, a IMI leva a nítido aumento da morbidade e mortalidade, assim como ao consumo de muitos recursos sociais e de saúde.

Os sinais e sintomas clínicos da aterosclerose dos membros inferiores se apresentam de modo variado, estando presentes em 5% da população geral acima de 50 anos nos países desenvolvidos. Cerca de 20 a 30% desses pacientes evoluem para isquemia crítica, com necessidade de revascularização, e em 10% destes, alguma amputação será necessária (McDermott et al., 2000). No Brasil estes dados são superiores, pois cerca de 60% dos pacientes com isquemia crônica da extremidade evoluem para amputação primária, sendo considerado não só um problema de saúde pública, mas também um problema social (XIV Fórum da SBACV-2003). Esses dados justificam a tentativa de revascularização, mesmo naqueles casos cujo prognóstico é reservado, devido não só à condição psicossocial daquele que sofre amputação do membro inferior, mas também para redução de custos com os procedimentos e com a necessidade de futura reinclusão social e profissional (McDermott et al., 2000).

A principal manifestação clínica da doença é a claudicação intermitente, definida como dor das pernas, que piora com a marcha e melhora após a interrupção da mesma. Num período de 5-10 anos, cerca de 70% desses pacientes permanecerão assintomáticos ou oligossintomáticos, mas 30% apresentarão sintomas progressivos e poderão ter indicação de revascularização arterial. Cerca de 20% destes evoluirão da claudicação intermitente para a isquemia crítica do membro, e os 10% restantes terão indicação de amputação menor, um ou mais pododáctilos ou parte do pé, com uma incidência abaixo de 4% para amputação maior, na perna ou coxa.

Decorrente desse elevado impacto social, a comunidade científica tem se empenhado no estudo dos fatores causadores da isquemia de membros, bem como no desenvolvimento de métodos preventivos para o seu controle.

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA DE MEMBROS INFERIORES

O endotélio vascular foi considerado, durante várias décadas, como uma camada unicelular que atuava como uma barreira semipermeável entre o sangue e o interstício. Uma série de evidências tem demonstrado que o endotélio desempenha uma gama de importantes funções biológicas, participando de várias vias metabólicas e regulatórias. Além das funções especializadas, como troca de gases na circulação pulmonar e fagocitose na circulação hepática e esplênica, conhecidas de longa data, o endotélio vascular desempenha papéis universais na circulação, que incluem a participação no controle sobre a trombólise e a trombose, o crescimento vascular, as interações entre plaquetas e leucócitos com a parede vascular e o tônus vasomotor (Caramori e Zago, 2000).

O endotélio é uma camada contínua de células revestindo toda a árvore vascular que regula vários aspectos do sangue e funções dos vasos sanguíneos. Células endoteliais em repouso mantêm uma interface sangue-tecido não trombogênica, modulam a inflamação e afetam o crescimento de outros tipos celulares, particularmente células do músculo liso. As células endoteliais influenciam a vasorreatividade das células musculares lisas subjacentes através da produção de fatores relaxantes como óxido nítrico (Robins, 2013).

A alteração de qualquer uma destas propriedades resulta a disfunção endotelial, um dos elementos fundamentais em todo o processo da aterogênese (Ross, 1993). As lipoproteínas plasmáticas realizam o papel de transportadoras do colesterol pela árvore arterial, incluindo a LDL, (*low density lipoprotein*), que quando oxidadas, na camada subendotelial, iniciam o processo de disfunção endotelial, assim como a ocorrência de ROS, fluxo sanguíneo turbulento e oscilatório, também contribuem diretamente para a disfunção do endotélio (Ross, 1999).

O fluxo sanguíneo, nesse contexto, é particularmente importante, porque sistematicamente o local de início do processo de aterosclerose são nas áreas de ramificações arteriais. Nestes locais o fluxo do sangue tem maior pressão, o que traz como consequência um evidente aumento da permeabilidade endotelial a macromoléculas como a LDL (Gimbrone Jr, 1999). Esse aumento da permeabilidade por um período elevado, faz

com que a função oxidativa do espaço subendotelial fique alterada, sinalizando o sistema de defesa que passará a tentar o reestabelecimento da homeostase naquele tecido (Steinberg et al., 1989).

Diante deste cenário a inflamação participa da resposta protetora, que envolve as células do hospedeiro, vasos sanguíneos, proteínas e outros mediadores, que se destina a eliminar a causa inicial da lesão celular (Kumar et al., 2013). A deposição de leucócitos (monócitos) sobre o endotélio lesado e sua penetração no espaço subendotelial são mediadas por moléculas de adesão, expressas no endotélio e nas células circulantes. Entre as moléculas de adesão endotelial, VCAM-1, (*vascular cell adhesion molecule-1*), as P- e E-selectinas e a molécula de adesão intracelular ICAM-1, (*intracellular adhesion molecule-1*) (Li et al., 1993; Dong et al., 1998; Collins et al., 2000).

### 1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Os radicais livres cujos elétrons encontram-se no átomo de oxigênio e nitrogênio são denominados, respectivamente, de espécies reativas de oxigênio (Abrahão, 2007). Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O<sub>2</sub> e também em situações não fisiológicas, como a exposição da célula a estressores que provocam a redução incompleta de O<sub>2</sub> (Ross e Moldeus, 1991).

As consequências da isquemia, em diferentes tecidos, dependem de sua duração e muitas lesões ocorrem durante a reperfusão tecidual devido ao estresse oxidativo. O excesso de produção de substâncias reativas, como EROs, dificulta ou impede a neutralização por agentes antioxidantes endógenos, como glutatona e superóxido dismutase, resultando no estresse oxidativo (Silva Jr. et al., 2002; Gilgun-Sherkiet al., 2002). Esse processo pode culminar na adaptação, por aumento da resposta antioxidante, no dano tecidual por agressão a fosfolipídios, carboidratos, aminoácidos, DNA ou na morte celular por necrose ou apoptose (Kunz et al., 2010).

### 1.4 AUTOFAGIA E BIOGÊNESE MITOCONDRIAL

O músculo esquelético é capaz de adaptar-se em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos, sendo que a mitocôndria possui função central nessa característica desse tecido (Ljubicic et al., 2010). A mitocôndria é uma das organelas mais intensamente estudadas na célula

(Viña et al., 2009), sua função energética foi essencial para o surgimento das células eucarióticas, bem como o desenvolvimento de organismos complexos (Nisoli e Carruba, 2006).

A autofagia é um processo evolutivo conservado nos lisossomos, que tem por objetivo regular a renovação dos constituintes celulares, pela degradação de proteínas e organelas, através da via autofagossomo/lisossomo. A autofagia é importante para manter a homeostase e serve como um mecanismo de adaptação quando há uma baixa disponibilidade de nutrientes como ocorre imediatamente após o nascimento e nos processos de diferenciação e desenvolvimento normal (Kuma et al., 2004; Uchiyama et al., 2008). Entretanto ela também é uma estratégia que as células utilizam para sobreviver frente a uma situação de estresse. Apesar da autofagia ser considerada essencial para a manutenção da homeostase celular, a ativação excessiva dessa via pode destruir partes do citosol e das organelas levando ao colapso total de todas as funções celulares. Por estes efeitos antagônicos da autofagia é que seu papel nos processos celulares de sobrevivência e morte ainda não estão completamente esclarecidos (Codogno e Meijer, 2005; Erlich et al., 2006).

O controle celular sobre as mudanças adaptativas na quantidade de mitocôndrias requer a capacidade de detectar a necessidade de produção adicional de energia mitocondrial, seguida pelo desencadeamento de vias de sinalização que resultarão em um aumento da expressão de genes para a formação de novas mitocôndrias na célula (Clementi e Nisoli, 2005). O processo de biogênese mitocondrial refere-se não apenas à formação de novas mitocôndrias, mas também ao processo de aumento da organela e da expressão de enzimas relacionadas à sua função. É um processo complexo, uma vez que a mitocôndria é derivada de genomas nucleares e mitocondriais (Hood, 2009). Diferentes estímulos, como a ativação simpática, o exercício físico, a queda da temperatura corporal, as espécies reativas de oxigênio, dentre outros, podem ativar a biogênese mitocondrial (Nisoli et al., 2003; Nisoli et al., 2008; Hood, 2009; Kowaltowski et al., 2009).

Sendo assim, no músculo esquelético, a regulação da biogênese mitocondrial, que se dá a partir de seus principais fatores de transcrição, como a PGC-1 $\alpha$  e a mtTFA é particularmente importante visto que as mitocôndrias possuem funções essenciais em seu metabolismo (Schrauwen e Hessenlink, 2004). O PGC-1 $\alpha$  é também importante regulador da biogênese mitocondrial no tecido adiposo e no músculo esquelético (Liang et al., 2006). Sua atividade é mediada pela interação com os fatores de transcrição NRF 1 e 2 (fatores respiratórios nucleares

1 e 2) e pela expressão de TFAM (fator de transcrição mitocondrial). Estes fatores estão envolvidos na regulação coordenada da expressão de genes codificados no DNA nuclear e mitocondrial respectivamente (Scarpulla, 2008; Scarpulla, 1997; Parisi e Clayton, 1991; Short et al., 2003). Assim, quando expresso, o PGC-1 $\alpha$  eleva a expressão de proteínas da cadeia respiratória e de enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e tecido adiposo (Tiraby et al., 2003; Lin et al., 2001).

Estudos envolvendo substâncias que atuem nessas vias ainda são pouco esclarecedores, e é fundamental para auxiliar no tratamento clínico de pessoas acometidas pela isquemia.

### 1.5 N-ACETILCISTEÍNA - NAC

A N-acetilcisteína (NAC), é um tiol-composto, com propriedade mucolíticas sendo largamente utilizado na prática clínica (Arfsten et al, 2004; Wang et al, 2010), é precursora da cisteína e glutathiona, conhecida por sua ação antioxidante e utilizada na prática clínica para o tratamento da intoxicação por paracetamol e como expectorante (Jones, 1998). Sua atividade antioxidante pode ser dita como direta ou indireta, como precursor da glutathiona, tendo papel-chave na homeostase celular, visto que a depleção de glutathiona pode causar morte celular devido à peroxidação lipídica e declínio nos níveis de tiol-proteína (Cuzzocrea, 2000). Tem sido largamente estudado na profilaxia da nefropatia induzida por contraste e na diminuição das lesões causadas pela síndrome de reperfusão renal, pulmonar e intestinal (Mansano et al., 2012).

A NAC atua também no processo de remoção de ROS, possui também ação vasodilatadora, atuando assim, na microcirculação, restabelecendo a atividade dos fatores de relaxamento derivado do endotélio. Efeitos protetores adicionais de NAC pode estar na capacidade deste composto em regular a ação de sistemas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (Massy e Ngunyen, 2002) ou aumentar a atividade catalítica de glutathiona peroxidase (Trimarchi et al., 2003). A NAC tem demonstrado reduzir a disfunção endotelial, inflamação, fibrose e diminuir a lesão provocada pelo tempo de isquemia do enxerto e os níveis de malondialdeído (MDA) em pacientes renais crônico (Massy e Nguyen-Khoa, 2002; Trimarchi et al., 2003)

O surgimento destas evidências, mostra que a ação do NAC pode alterar sistemas de fluxo sanguíneo da microcirculação e oxigenação dos tecidos, hora comprometidos pelo processo isquêmico. Contudo, o efeito



protetor da NAC na isquemia crítica dos membros inferiores não foi completamente elucidado. O trabalho visa contribuir no tratamento desta patologia, avaliando para isto a expressão das proteínas com papel de marcadores de autofagia: LC3, ATG3, ATG16, Beclin, marcadores de mitofagia: PINK, PARKIN, marcadores de biogênese mitocondrial: PGC-1 $\alpha$ , TFAM, NRF-1, consumo de oxigênio (normóxia e hipóxia).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos da NAC sobre dinâmica mitocondrial em modelo animal de isquemia crônica de membros inferiores.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os efeitos da NAC sobre o consumo *ex-vivo* de oxigênio em normóxia e hipóxia no modelo animal de isquemia crônica de membros inferiores.
- Determinar os efeitos da NAC sobre marcadores de autofagia LC3A/B, ATG3, ATG16 e Beclina em modelo animal de isquemia crônica de membros inferiores;
- Determinar os efeitos da NAC sobre marcadores de mitofagia PINK e PARK em modelo animal de isquemia crônica de membros inferiores;
- Determinar os efeitos da NAC sobre marcadores de biogênese mitocondrial, PGC1- $\alpha$ , NRF1 e TFAM, em modelo animal de isquemia crônica de membros inferiores.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Deve-se ressaltar que todos os animais receberam cuidados de acordo com os “Princípios de Cuidados para Animais de Laboratório” formulado pela Sociedade Nacional para Pesquisas Médicas aprovada pelo Conselho da Sociedade Americana de Fisiologia, e todo o projeto foi executado dentro das normas estabelecidas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) para pesquisas utilizando animais. E os mesmos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade antes de sua execução, sob o número de protocolo 031/2016-1.

#### 3.1 ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados Ratos *Wistar*, com aproximadamente 2 meses de vida, pesando entre 250-300g, acondicionados em 5 por gaiola, procedentes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Os animais permaneceram em um ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) livre acesso a comida e água. O ambiente é mantido a temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Foram excluídos animais que apresentaram qualquer deficiência ou comportamento anormal. Estas condições foram garantidas por profissionais do biotério até que os experimentos da pesquisa tivesse início. Após o início, os animais foram manipulados por pessoas qualificadas para tratar esses animais de maneira humanitária evitando dores e estresse desnecessários a estes animais. Ao final dos experimentos, os animais foram mortos sob estrita obediência às prescrições científicas. Todos os animais durante ou após a realização dos experimentos, receberam cuidados especiais, e não foi aceito qualquer tipo de abuso ou crueldade desnecessária uma vez que o animal é dotado de sensibilidade, de memória e que sofre sem poder escapar da dor. Para isso, os estudos foram realizados de maneira a obter o máximo de informações utilizando-se o menor número possível de animais.

#### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado com 21 animais, dividido em três grupos de 07 animais cada: Grupo Sham (1), Grupo Isquemia (2) e Grupo Isquemia tratado com NAC (3). No grupo sham os animais tiveram apenas as artérias femoral comum e ilíaca comum dissecadas e os vasos

manipulados. Os animais do grupo isquemia tiveram as mesmas artérias dissecadas e cauterizadas utilizando metodologia de eletrocoagulação instantânea.

### 3.3 INDUÇÃO DE ISQUEMIA DE MEMBRO INFERIOR

Os animais foram submetidos ao processo de indução de isquemia do membro inferior direito através da dupla eletrocoagulação das artérias ilíaca comum e femoral comum. Os animais foram anestesiados com anestésico cloridrato de cetamina (Vetaset, Zoetis®) na dose de 80 mg/Kg e com relaxante muscular cloridrato de xilazina (Rompum, Bayer Healthcare®) na dose de 20 mg/Kg de peso por meio de injeção intraperitoneal. Inicialmente realizamos uma incisão cutânea longitudinal na região inguinal, se estendendo por cerca de 2 cm distalmente ao ligamento inguinal até 2 cm proximalmente ao mesmo. Após a incisão o tecido subcutâneo foi dissecado cuidadosamente até evidenciarmos os vasos inguinais. Após evidenciarmos a artéria femoral comum, a mesma foi individualizada e reparada com fio de algodão 4,0, proximalmente à artéria epigástrica superficial. O nervo e a veia femoral foram afastados cuidadosamente. Após reparo da artéria femoral comum, prosseguimos a dissecação proximal para expormos a artéria ilíaca comum utilizando acesso retroperitoneal. Para dissecação do acesso retroperitoneal o peritoneo foi afastado proximalmente através de dissecação romba, cuidadosa, utilizando cotonetes até a visualização da artéria ilíaca comum. A artéria ilíaca interna serviu como marcador distal da ilíaca comum, onde realizamos a eletrocoagulação proximalmente. A artéria ilíaca comum foi reparada com fio de algodão 4.0 e separa do nervo e da veia. Após termino da dissecação e reparo das artérias ilíaca comum e femoral comum a eletrocoagulação foi realizada com aparelho de eletrocautério, primeiramente na artéria ilíaca comum, com eletrocoagulação até secção total da artéria, seguida da eletrocoagulação da artéria femoral comum. Os cotos arteriais pós-secção foram afastados por alguns milímetros através de sutura proximal e distal com afastamento dos mesmos. Após o término do procedimento realizamos a síntese da ferida operatória com fio mononaylon 4,0 (Zeviani e Donato, 2004).

Após a indução da isquemia, os animais receberam reposição volêmica por meio de administração subcutânea de solução salina na concentração de 0,9% (p/v), e antibiótico Ceftriaxona (EMS®) na dose de 25 mg/kg de peso.

### 3.4 TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA

Após 24 horas da indução da isquemia, os animais receberam uma dose oral diária de N-acetilcisteína via tubo intra-gástrico de 30 mg/kg/dia por 30 dias (Arfsten et al., 2004). Os animais do grupo controle receberam uma dose diária no mesmo volume de salina via tubo intra-gástrico durante os 30 dias e no mesmo horário. Após o período de tratamento o músculo solear foi retirado, sendo rapidamente isolado e parte dele já direcionado as análises de consumo de oxigênio imediatamente, e o restante armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises.

### 3.5 ANÁLISES

#### 3.5.1 Avaliação do Consumo de Oxigênio

##### *Preparação do tecido muscular*

Foi retirado o tecido muscular da pata direita traseira (músculo solear), e então foi necessário divulsionar o tecido (fazendo uma espécie de rede fina), assim, o tecido divulsionado permaneceu por 10 minutos em um tampão contendo 225 mM manitol, 75 mM sacarose, 1 mM EGTA, 0,1% BSA e 10 mM HEPES, pH 7,2 (tampão isolamento) contendo mais 20  $\mu\text{L}$  de digitonina 10%. O segundo passo foi transferir o tecido para um meio de tampão de isolamento sem digitonina por 10 minutos. O terceiro passo foi transferir o tecido para outro meio contendo 225 mM manitol, 75 mM sacarose, 0,1% BSA e 10 mM HEPES, pH 7,2 (tampão de isolamento 2) por 10 minutos, e por último, transferir o tecido para outro recipiente com tampão de isolamento 2 por 10 minutos. A amostra ficou sob refrigeração todo o período.

##### *Avaliação de Parâmetros Respiratórios*

A taxa de consumo de oxigênio foi medida por oximetria de alta resolução (Oroboros), em um meio de incubação com agitação magnética e temperatura controlada ( $37^{\circ}\text{C}$ ) utilizando glutamato/malato (2,5 mM cada),  $\alpha$ -cetoglutarato (5,0 mM), succinato (5,0 mM) como substratos respiratórios. Preparações de tecido muscular solear divulsionadas, foram incubadas em tampão contendo 300 mM sacarose, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EGTA, 0,1% BSA e 5 mM MOPS (pH 7,4). Após a depleção de substratos endógenos, o estado 3 da respiração

mitocondrial foi iniciado pela adição de 1 mM ADP. A amostra ficou no meio até atingir a depleção completa do oxigênio (estabilização do consumo de oxigênio). Após, foi retirado o excesso de água (tampão) da amostra e esta foi pesada (convertendo-se o resultado em mg). Os resultados foram expressos em nmol O<sub>2</sub>/min/mg de tecido, de acordo com Rosenthal et. al (1987).

### 3.6 ANÁLISE DE MARCADORES DE AUTOFAGIA/MITOFAGIA POR WESTERN BLOTTING

A expressão proteica de marcadores de autofagia: ATG16, ATG 3, Beclin, LC3A/B, e de mitofagia: PINK e PARKIN no músculo solear isquêmico foi mensurada usando análise por *Western blotting*.

Para executá-lo as amostras foram homogeneizadas em tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% (w/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% (v/v) de glicerol) e quantidades iguais de proteína (30ug/poço) foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. A eficiência da eletrotransferência foi verificada por meio de coloração Ponceau S, e a membrana foi bloqueada em Tampão Tween-Tris salina (TTBS: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 contendo 0,9% de NaCl e 0,1% de Tween 20) com 5% de albumina. As membranas foram incubadas overnight a 4°C com anticorpo policlonal de coelho anti-ATG16, ATG3, Beclin, LC3A/B e Beta actina (todos na concentração de 1:1000). Anticorpo secundário Anti-IgG de coelho foi incubado com as membranas durante 2 horas (1:10000), a membrana foi lavada novamente com TTBS, e a imunorreatividade foi detectada por quimioluminescência amplificada utilizando ECL. A análise densitométrica dos filmes foi realizada com o software Image J® v.1.34. Todos os resultados foram expressos como uma razão relativa entre o alvo e o imunocónteuído de proteína β-actina.

### 3.7 ANÁLISE DE MARCADORES DE BIGÊNESE MITOCONDRIAL POR PCR

#### 3.7.1 Extração de RNA Total

As amostras foram homogeneizadas em reagente comercial a base de etanol e tiocianato de guanidina (TRIzol - Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante (200 mg tecido/1 ml de Trizol e 5min de incubação após a homogeneização). Após foram adicionados 200µl de



clorofórmio para cada ml de homogenato e centrifugado 12.000 rcg por 15min a 4°C.

A fase aquosa das amostras foi transferida para outro eppendorf e será adicionado 500µl de álcool isopropílico para cada amostra, incubar a temperatura ambiente e centrifugar a 12.000 rcg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet foi mantido. O pellet foi lavado com etanol 75% e centrifugado a 7500 rcg por 5 min a 4°C. Etanol foi removido e o pellet ressuspensionado em 10ul de água livre de RNase.

### 3.7.2 Determinação da pureza de RNA

Ao final da extração as amostras foram ressuspensionadas em 100 µl de água livre de RNase para biologia molecular. Para a determinação da concentração e da pureza do RNA foi utilizado o espectrofotômetro Spectramax a partir da absorbância a 260 nm, e razões 280/260 nm e 260/230 nm, respectivamente. Esse valor deve apresentar-se acima de 1,8 para ser aceitável.

### 3.7.3 Síntese do cDNA

O cDNA foi preparado a partir do RNA total, utilizando 1 µg de RNA de cada amostra. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit Protoscript II ST STRAND CDNA syn (Uniscience cód:E65650S) a partir de 6 µl de amostra na concentração de 1µ, acrescido de dNTP (50 µM) e oligo-(dT)15 (1 µM). As amostras foram incubadas por 5 min a 65°C para síntese do cDNA. Após foi adicionado Protoscript II Mix 2X e Protoscript II Enzyme Mix 10X e incubados por uma hora a 42°C e mais 5 min a 80°C para inativar a enzima. O cDNA preparado pode ser armazenado a -80°C para posterior análise.

**Tabela 1 - Sequências de Primers para RT-qPCR**

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Gapd<sup>a</sup></i>	5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTCA-3'	5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3'
<i>NRF-1<sup>b</sup></i>	5'-TTACTCTGCTGTGGCTGATGG-3'	5'-CCTCTGATGCTTGCCTGCTCT-3'
<i>PGC-1α<sup>c</sup></i>	5'-CGTTACACCTGTGACGCTTTCGCTG-3'	5'-CATACTGCTCTTGGTGGAAAGCAGG-3'
<i>TFAM<sup>d</sup></i>	5'-AATTGAAGCTTGTAATCAGGCTTGG-3'	5'-CGGATGAGATCACTTCGCCAAC-3'

Fonte: Bonefeld et al., 2008;Zhang et al., 2012.

Todas as reações de qPCR neste estudo foram realizadas utilizando o kit SYBR gene PCR Master Mix (Invitrogen). As reações de 20 µl contém 10 µl de SYBR Green qPCR Mix 1X, que possui o fluoróforo SYBR Green I, Taq polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> e o tampão da enzima, e os 10 µl restantes foram adaptados entre amostra, iniciadores (primers) e H<sub>2</sub>O.

Os ensaios foram realizados no termociclador da marca Life (7500 Fast). Os programas de ciclagem de cada gene incluem ativação da enzima no Holding Stage a 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, em seguida 40 ciclos de 15s de desnaturação a 95°C e 1 min de anelamento com a temperatura de 60°C, ao final na curva de dissociação (Melt Curve Stage) os ciclos foram de 95°C por 15s, 60°C por 1 min e 95°C por 15s para analisar o perfil dos produtos formados (Tabela 1).

Cada par de iniciadores foi testado inicialmente em duplicatas de 100 ng de uma mistura de cDNA dos diferentes tempos de exposição, de ambos locais. Em seguida os iniciadores foram testados nas concentrações de 250 nM, 500 nM, 750 nM e 1000 nM. A escolha da concentração a ser utilizada nos ensaios foi baseada nos valores de CT, onde o menor valor foi selecionado, refletindo uma maior eficiência da reação. A análise da curva de dissociação também foi determinante na escolha da concentração de iniciador para as reações. As condições encontradas fora testadas na construção de uma curva padrão, construída a partir de diluições seriadas de cDNA. As curvas padrão servirão como teste da eficiência da reação, onde uma curva padrão ótima apresenta valor de eficiência de 1 (100% de amplificação por ciclo), situação na qual as concentrações da curva devem corresponder com as diluições realizadas. O programa disponível pela *Life technologies* transforma os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica, e assim o limiar foi delimitado baseando-se no coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) e na eficiência da curva, calculada pelo próprio aparelho.

#### 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

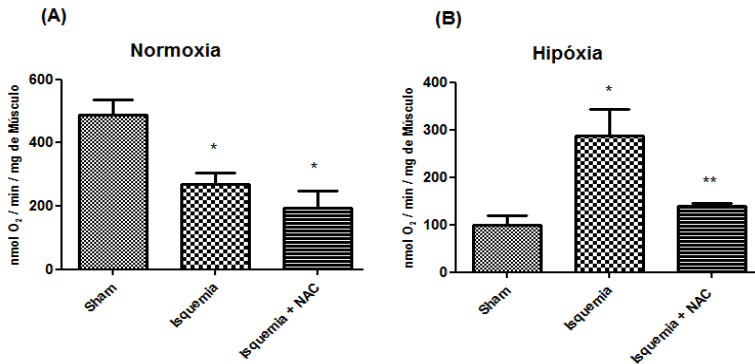
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e o  $p < 0,05$  sendo considerado significativo. Western blotting foi quantificado pelo programa Image J. PCR foi verificado pela razão entre Alvo/Gapdh. As diferenças entre os grupos foram determinadas pela análise de variância de uma via, através do teste ANOVA pos-hoc Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software SPSS 22.0 (SPSS, Chicago, IL) e Prism Graph.



## 5 RESULTADOS

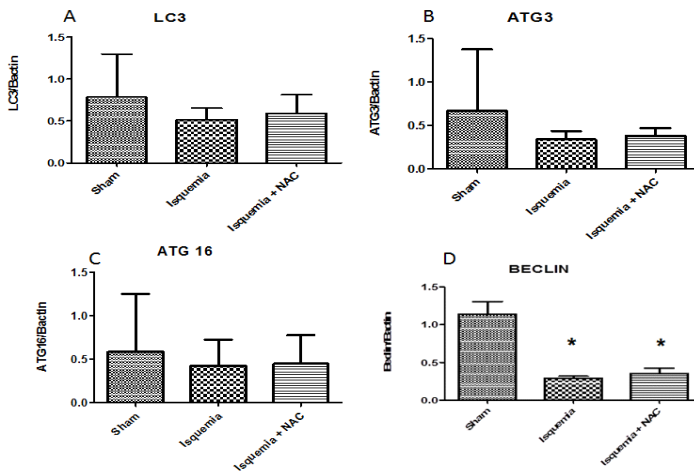
Inicialmente, avaliamos o consumo de oxigênio nas amostras de musculo obtidas após o processo de isquemia e o tratamento com NAC(Figura 1). Observamos uma redução no consumo de oxigênio em normóxia no músculo dos animais submetidos a isquemia. Este padrão não foi alterado pelo tratamento com NAC. Por outro lado, em condições de hipóxia existe um aumento no consumo *ex vivo* de oxigênio em animais submetidos a isquemia crônica, e este efeito foi revertido pelo uso de NAC.

Para entender melhor a adaptação da mitocôndria a respiração em hipóxia medimos expressão de marcadores de dinâmica mitocondrial. Quando avaliamos expressão de marcadores ligados ao processo de autofagia não observamos diferenças significativas entre os grupos para LC3, ATG3, e ATG16 (Figura 2). Entretanto, quando mensuramos a expressão da Beclina observamos que o grupo isquemia teve um aumento significativo estatisticamente comprado ao grupo controle (Sham), e essa expressão foi diminuída nos animais que receberam tratamento com NAC (Figura 2). Quando avaliamos a expressão de marcadores de mitofagia, PINK e PARKIN, não observamos diferença significativas em nenhum dos grupos analisados (Figura 3). Avaliamos também marcadores envolvidos na biogênese mitocondrial, PGC-1 $\alpha$ , TFAM e NRF-1, (Figura 4).Observamos que PGC-1 $\alpha$  esteve aumentado no grupo isquêmico comparado ao grupo Sham, e este efeito foi reduzido pelo tratamento com NAC. O tratamento com NAC também reduziu o conteúdo de TFAM (Figura 4).No entanto NRF-1 não mostrou alteração significativa em nenhum dos grupos avaliados.



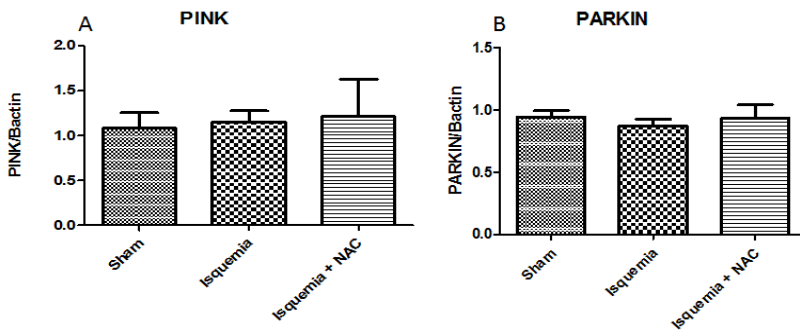
**Figura 1- Consumo de Oxigênio em músculo sólear.**

(A) Normoxia (B) Hipóxia. Os dados foram comparados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* Tukey.



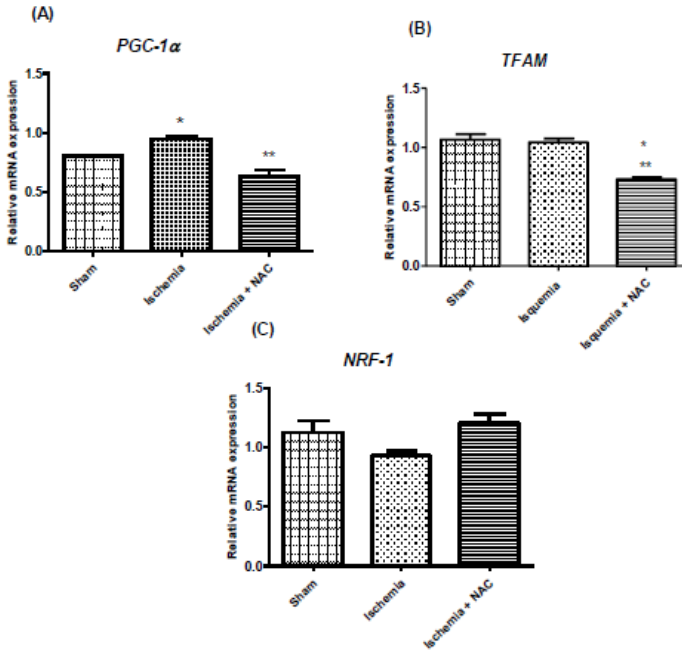
**Figura 2- Expressão proteica dos marcadores de autofagia em ratos submetidos à isquemia crônica de membros.**

(A) LC3; (B) ATG3; (C) ATG16; (D) BECLIN. Dados expressos em ug/proteína de homogenato de tecido como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram comparados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* Tukey, \*diferente de Shamp<0,05.



**Figura 3- Quantificação gênica de marcadores de mitofagia em ratos submetidos à isquemia crônica de membros inferiores.**

(A) PINK e (B) PARKIN. Dados expressos em ug/proteína de homogenato como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram comparados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* Tukey.



**Figura 4: Biogênese mitocondrial- expressão gênica.**

(A) PGC-1 $\alpha$ ; (B) TFAM; e (C) NRF-1. Dados expressos em  $\mu\text{g/proteína}$  de homogenato de tecido como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram comparados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* Tukey, \*diferente de Sham, \*\* diferente de Isquemia + NAC  $p < 0,05$ .



## 6 DISCUSSÃO

Nesta dissertação foi observado uma redução no consumo de oxigênio em normóxia no músculo de animais submetidos a isquemia, já na hipóxia este padrão é oposto, ou seja um aumento no consumo *ex vivo* de oxigênio, padrão que foi revertido exclusivamente em hipóxia com o tratamento com NAC. Para tentar explicar estes achados foram medidos marcadores de autofagia que não estavam consistentemente alterados no modelo, assim como marcadores de mitofagia. Contudo, alguns marcadores de biogênese (TFAM e PGC-1 $\alpha$ ) foram modulados pelo tratamento com NAC.

O músculo estriado esquelético é altamente dependente de energia, na forma de moléculas de ATP, e grande parte desta energia deriva das mitocôndrias (Walker PM,1991). As espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) podem ser produzidos pelos miócitos (Mason e Wadley, 2014), sendo que as mitocôndrias das células musculares estriadas esqueléticas são a fonte predominante de ROS (Phaniendra et al., 2015). Neste local ROS são produzidas principalmente pelos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial, sendo que alguns grupos de pesquisa mostraram maiores concentrações de ROS nas mitocôndrias glicolíticas (Marcos e Winston, 2014; Picard et al., 2012), enquanto outros observaram maiores concentrações de ROS nos músculos oxidativos (Narendra et al, 2010, McMillan e Quadrilatero, 2011). As espécies reativas primárias produzidas nos miócitos são o Ânion superóxido e o NO, que levam à formação de várias espécies reativas secundárias, tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radical hidroxil (HO $\cdot$ ) e peroxinitrito (Silvestre et al, 2013). A produção de radicais livres são eliminadas por sistemas antioxidantes, como, os sistemas enzimáticos e não-enzimáticos, como catalase, superóxido dismutase (SOD), glutationaperoxidase (GPx), glutationa, tiorredoxinaredutase, coenzima Q e vitamina E, nos miócitos, endotélio e espaço extracelular (Silvestre et al., 2013; Jackson, 2011). No entanto, a atividade das enzimas antioxidantes, particularmente GPx, é significativamente menor nos músculos glicolítico do que oxidativo (Picard et al., 2012; Choksy et al., 2004; Powers et al., 2007; Tupling et al., 2001). A NAC é um importante precursor da glutationa (GSH), com propriedades antioxidantes, muito utilizada na prática clínica (Mansano et al., 2012; Tredger, 2000). Devido a este fato, suplementamos NAC a animais que foram expostos ao processo de indução isquêmica crônica de membros inferiores.

Kocman et al. (2015) demonstraram uma elevada concentração de MDA após a isquemia de membros inferiores de ratos. Estudos tem demonstrado que a isquemia prolongada estimula a produção de ROS, e que esta ausência de oxigênio em nível tecidual provoca alterações importantes e diversos danos moleculares como: danos a lipídios, aminoácidos, proteínas carreadoras (Wallace, 2013). Estudos sugerem que a exposição tecidual a tempos elevados de hipóxia podem estimular demasiadamente a produção de ROS. (Weiss et al., 2013). Sendo assim o tempo de exposição do tecido a isquemia é um fator determinante nos danos provocados pela lesão isquêmica e na viabilidade fisiológica do membro acometido. Nos primeiros 120 minutos de isquemia, a um aumento na produção energética pela via anaeróbica, onde o ATP é ressintetizado na ausência de oxigênio. Essa manutenção metabólica gera marcadores como o lactato sanguíneo que é um importante marcador respiratório, levando ao estresse extremo do membro acometido pela injúria. Observa-se paralelamente redução no pH e redução dos estoques do ATP e da creatina. Após 180 minutos de isquemia os estoques de ATP diminuem drasticamente e há piora da acidose. A determinação do esgotamento total de ATP dependerá do grupo muscular analisado, visto que, existem grupos que tem um predomínio maior de células musculares que se utilizam da mitocôndria para a síntese de ATP, na CTE. Como resultado destas alterações encontraremos edema celular da matriz e das cristas mitocondriais (Silveira, 2004).

A mitocôndria tem papel central no metabolismo respiratório e energético dentro da célula (Hatefi, 1985). A exposição crônica desta organela a períodos de pouca ou nenhuma oferta de oxigênio pode torná-la vulnerável a danos oxidativos, lipídicos, proteicos e no DNA da célula (Sena e Chandel, 2012). O entendimento da fisiopatologia da isquemia através dos procedimentos de fluxo sanguíneo reparatórios teciduais e adaptativos tem auxiliado no mapeamento da patologia e ampliando as possibilidades de tratamento. Instalado o processo isquêmico, o local acometido pela diminuição da oferta de oxigênio lançará mão de mecanismos de defesa a fim de solucionar o problema ora ocasionado pela hipóxia. Vias relacionadas ao metabolismo anaeróbico, para suprimento energético e balanço inflamatório serão vias estimuladas em conjunto para minimizar o dano tecidual ocorrido no local (Pipinos, 2003). Neste contexto dos processos patológicos de arteriogênese, vasculogênese e angiogênese, tornam-se fundamentais para a manutenção da viabilidade fisiológica do membro acometido pela isquemia (Silvestre, 2013). Associada também a baixa oferta de

oxigênio, as células começam a se auto digerirem, um processo descrito como autofagia, que tem como base a manutenção da viabilidade da mitocôndria. A autofagia é uma estratégia que as células utilizam para sobreviver frente a uma situação de estresse. Embora este processo não esteja completamente esclarecido (Codogno e Meijer, 2005; Erlich et al., 2006), entende-se que ela serve como um mecanismo de adaptação quando existe baixa disponibilidade de nutrientes como ocorre imediatamente após o nascimento e nos processos de diferenciação e desenvolvimento normal (Kuma et al., 2004; Uchiyama et al., 2008). Na mitocôndria este processo autofágico é seletivo e ocorre com concentrações de nutrientes adequados e é denominado de mitofagia. Este processo mitofágico é importante para a manutenção da qualidade e o número de mitocôndrias (Yole e Narendra, 2011). Os marcadores PINK e PARKIN são os reguladores deste processo mitofágico. O recrutamento específico dos autofagossomos é mediado por proteínas. A perda do potencial de membrana mitocondrial leva ao acúmulo de PINK na superfície da membrana e à restauração de Parkin, que ubiquitina as proteínas externas à membrana mitocondrial para o reconhecimento do autofagossomo que direcionará a mitocôndria para apoptose (Vives-Bauza et al., 2010, Narendra et al., 2010).

Nossos resultados sugerem que a mitocôndria tem uma eficiência melhor no consumo *ex vivo* de oxigênio em hipóxia (figura 1) demonstrando uma adaptação ao processo patológico, comparada aos grupo Sham. A NAC fez este parâmetro de consumo de oxigênio voltar ao normal, o que nos sugere que ela não interfere diretamente na função da mitocôndria, isto porque, não manteve o consumo de oxigênio alto durante o processo isquêmico, que era processo adaptativo esperado. Neste sentido fomos buscar outras formas de adaptação mitocondrial a isquemia, entretanto marcadores de autofagia e mitofagia não eram consistentemente alterados ou modulados por NAC. Por outro lado, assim como o consumo *ex vivo* de oxigênio, parâmetros de biogênese mitocondrial também foram reduzidos pelo tratamento com NAC. A mitocôndria portanto sofre processo adaptativo na isquemia aumentando o consumo de oxigênio para manter sua funcionalidade, mas esta adaptação não parece envolver mecanismos de biogênese, autofagia e mitofagia. Tão pouco, os efeitos da NAC sobre o consumo de oxigênio parecem envolver estes processos de adaptação mitocondrial sugerindo que o efeito da NAC deve ser por outro mecanismos como por exemplo alterações de VEGF ou de inflamação.

O processo de adaptações celulares e teciduais que ocorrem nas célula expostas ao processo isquêmico, no período crítico, foi descrito por

(Sérgio Rey, 2010). Neste estudo ele relata que um grande número de células associadas a regeneração celular que agem no remodelamento do processo de crescimento celular, resultando assim, na formação de novos vasos que auxiliarão na manutenção da perfusão tecidual (Hamada et al., 2011), em seus estudos evidenciaram que o VEGF, fator de crescimento do endotélio, atua na revascularização, mantendo o suprimento de oxigênio e nutrientes nos tecidos acometidos no processo isquêmico, e esta pode ser uma hipótese que explicaria a retomada aos níveis de Sham no consumo de oxigênio *ex-vivo* nos animais que receberam NAC. O VEGF (fator de crescimento derivado do endotélio) é provavelmente uma das respostas para as alterações de concentrações de oxigênio encontradas nos grupos que foram submetidos a hipóxia tecidual. Esta molécula pró-angiogênica atuou de forma significativa na fase crítica do experimento para que os tecidos dos animais acometidos pela isquemia fossem revascularizados, passando assim, a manter o suprimento de oxigênio e nutrientes ao tecido acometido pela isquemia, o que portanto, responderia a volta dos níveis de oxigênio *ex-vivo* de animais tratados com NAC aos encontrados no sham (Wallace, 2013). A expressão do VEGF aumenta gradualmente entre os dias 4 e 9 após a isquemia, com pico por volta do dia 9, mantendo-se constante a partir do 10 dia até o 14 dia (Hamada et al., 2011), embasando que essa citocina age fortemente para restaurar a fisiologia no local acometido pelo processo isquêmico, em seus estudos foram encontradas concentrações elevadas desta citocina. Também neste estudo (Wallace, 2013), avaliou a concentração da citocina IL6, que está envolvida na regulação de respostas imunes e inflamatórias, no processo de isquemia. Ela encontra-se atuante no processo isquêmico levando ao recrutando de células de defesa ao local lesionado (Akdis et al., 2011). Seus níveis estiveram aumentados no estudo e a NAC mostrou-se eficaz no tratamento, comprovando portanto que ela atua na regulação da inflamação e reparo tecidual.

## **6 CONCLUSÃO**

A NAC não modulou a dinâmica mitocondrial de maneira significativa, apesar de reverter o aumento no consumo de oxigênio em hipóxia. Este efeito não parece ser diretamente secundário a modulação dos processos de autofagia, mitofagia e biogênese mitocondrial. Novos estudos serão necessários para aprofundar nossos conhecimentos dos efeitos do tratamento com NAC na isquemia crônica dos membros inferiores.



## REFERÊNCIAS

- Abrahão S.A. Qualidade da bebida e atividade antioxidante do café *in vivo* e *in vitro*. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2007.
- Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127(3): 701-721 e 1-70.
- Arfsten D, Johnson E, Thitoff A, Jung A, Wilfong E, Lohrke S, Bausman T, Eggers J, Bobb A. Impact of 30-day oral dosing with N-acetyl-cysteine on Sprague-Dawley rat physiology. *Int J Toxicol*. 2004; 23(4): 239-247.
- Becker MO, Riemekasten G. Critical limb ischemia in systemic sclerosis. *Z Rheumatol*. 2012; 71(4): 261-9.
- Bonfeld BE, Elfving B, Wegener G. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse*. 2008; 62(4):302-9.
- Choksy S, Pockley AG, Wajeh YE, Chan P. VEGF and VEGF Receptor Expression in an Chronic Critical Limb Ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004; 28: 660–669.
- Clementi E, Nisoli E. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to longterm regulation of cellular metabolism. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol*. 2005; 142 (2): 102-110.
- Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: Their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*. 2005; 12: 1509-18.
- Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp.Med*. 2000; 191:189-194.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. Effects of N-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovas Res*. 2000; 47: 537 – 548.
- Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin.Invest*. 1998; 102: 145-152.
- Erlich S, Shohami E, Pinkas-Kramarski R. Neurodegeneration induces upregulation of Beclin 1. *Autophagy*. 2006; 2: 49-51.
- Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant Therapy in Acute Central Nervous System Injury: Current State. *Pharmacological Reviews*. 2002; 54(2) 271–284.

- Gimbrone MA, Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999; 82: 722-726.
- Hamada Y, Gonda K, Takeda M, Sato A, Watanabe M, Yambe T, Satomi S, Ohuchi N. In vivo imaging of the molecular distribution of the VEGF receptor during angiogenesis in a mouse model of ischemia. *Blood.* 2011; 118: 93-100.
- Hatefi Y. O transporte de elétrons mitocondrial e sistema de fosforilação oxidativa. *Annu. Rev. Biochem.* 1985; 54: 1015-1069.
- Hood DA. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2009; 34(3): 465-472.
- Jackson MJ. Control of reactive oxygen species production in contracting skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15: 2477–2486.
- Jensen A., Vatten LJ, Myhre HO. The Prevalence of Chronic Critical Lower Limb Ischaemia in a Population of 20,000 Subjects 40–69 Years of Age. *Eur J Vasc endovasc surg.* 2006; (32): 60–65.
- Jones AL. Mechanism of action and value of N-acetylcysteine in the treatment of early and late acetaminophen poisoning: a critical review. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1998; 36(4): 277-85.
- Kocman EA, Ozatik O, Sahin A, Guney T, Kose AA, Dag I, Alatas O, Cetin C. Effects of ischemic preconditioning protocols on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 193: 942–952, 2015.
- Kowaltowski, J, DE Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(4): 333-343.
- Kuma, A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 2004; 432: 1032-1036.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robins patologia básica.* Rio de Janeiro (RJ) 2013. Elsevier.
- Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology.* 2010; 24: 495-509.
- Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *ArteriosclerThromb.* 1993; 13, 197-204.
- Liang H, Ward, WF. PGC-1: a key regulator of energy metabolism. *Adv PhysioEduc.* 2006; 30: 145–151.
- Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EM, Lowell BB, Bassel-Duby R,



- Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002; 418: 797–801.
- Ljubicic V, Joseph AM, Saleem A, Ugucioni G, Collumarchese M, Lai RY. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800(3): 223-234.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407: 233-241.
- Maffei, FHA. Doenças vasculares periféricas. 3 ed. São Paulo: Medsi, 2002.
- Mansano AM, Vianna PT, Fabris VE, Silva LM, Braz LG, Castiglia YM. *Acta Cir Bras*. Prevention of renal ischemia/reperfusion injury in rats using acetylcysteine after anesthesia with isoflurane. *Acta Cir Bras*. 2012; 27(4): 340-345.
- Marcos da Silveira, Winston Bonetti Yoshida. Ischemia and reperfusion in skeletal muscle: injury mechanism and treatment perspectives. *J Vasc Br*. 2004; 3 (4): 367-378.
- Mason S, Wadley GD. Skeletal muscle reactive oxygen species: a target of good cop/bad cop for exercise and disease. *Redox Rep*. 2014; 19: 97–106.
- Massy ZA, Ngunyen-Khoa T. Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. *J nephrol*. 2002; 15: 306-341.
- Massy, Z A; Ngunyen-Khoa, T Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. *J nephrol*. 2002; 15: 306-341, 2002.
- McDERMOTT MM, Fried L, Simonsick E, Ling S, Guralnik JM. Asymptomatic peripheral arterial disease is independently associated with impaired lower extremity functioning: the women's health and aging study. *Circulation Dallas*, 2000; 101: 1007-1012.
- McMillan EM, Quadrilatero J. Differential apoptosis-related protein expression, mitochondrial properties, proteolytic enzyme activity, and DNA fragmentation between skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300: 531–543.
- Medeiros WA. Efeito da N-acetilcisteína em modelo murinho de isquemia crônica de membros inferiores. Dissertação (Mestrado)-Universidade do Extremo Sul Catarinense- UNESC, 2014.
- Narendra DP, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. This key paper demonstrates the recruitment of PINK1 as a stimulator of mitophagy *PLoS Biol*. 2010; 8:e1000298. [PubMed: 20126261]
- Nisoli E, Carruba MO. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *Journal of Cell Science*. 2006; 119 (14): 2855-2862.

- Nisoli E, Cozzi V, Carruba MO. Amino acids and mitochondrial biogenesis. *Am J Cardiol.* 2008; 101(11): 22-25.
- Nisoli, E. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science.* 2003; 7 (299): 896-899.
- Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *EurJVascEndovascSurg,* 2007; 33: S1—75.
- Parisi MA, Clayton DA. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science.* 1991; 252: 965-969.
- Paulo R. A, Caramori, Alcides J. Zago. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. Porto Alegre (RS), 2000.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015; 30: 11–26.
- Picard M, Hepple RT, Burelle Y. Mitochondrial functional specialization In glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;302: C629–C641.
- PipinosII, Sharov VG , Shepard AD , Anagnostopoulos PV , Katsamouris A , Todor A, Filis KA, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in skeletal muscle in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc.*2003; 38: 827–832.
- Powers SK, Murlasits Z, Wu M, Kavazis AN. Ischemia-reperfusioninduced cardiac injury: a brief review. *MedSci Sports Exerc.* 2007; 39: 1529–1536.
- Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 1987; 7: 752-758.
- Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. *In* Vigo-Pelfrey C. Membrane lipid oxidation. 1991;151-70.
- Ross R. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115-126.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993; 362: 801-809.
- Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 1997; 29: 109-119.
- Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.* 2008; 88: 611–638.

- Schrauwen P, Hesselink, MK. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53(6): 1412-1417.
- Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012; 48: 158–67.
- Sergio Rey, Gregg L. Semenza. Hypoxia-inducible factor 1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodeling. *Cardiovascular Research*. 2010; 86: 236–242.
- Short KR, Vittone JL, Bigelow ML. Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes*. 2003; 52(8): 1888-1896.
- Silva Jr OC, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré condicionamento isquêmico. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2002; 17(3): 96-100.
- Silveira M, Yoshida WB. Ischemia and reperfusion in skeletal muscle: injury mechanisms and treatment perspectives. *J Vasc Br*. 2004; 3 (4): 367-378.
- Silvestre JS, Smadja DM, Lévy BI. Revascularização pós-isquémico: a partir de mecanismos celulares e moleculares para aplicações clínicas. *Fisiológico Rev*. 2013; 93 (4):1743-1802.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989; 320: 915-924.
- Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem*. 2003; 278: 33370–33376.
- Tredger JM. N-acetylcysteine: not a simply glutathione precursor. *Transplantation*. 2000; 69: 703-704.
- Trimarchi H, Mongitore MR, Baglioni P, Forrester, B, Freixas M, Schropp M, Pereira H, Alonso M. N-acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients – a pilot study. *Clin Nephrol*. 2003; 59: 441-446.
- Tupling R, Green H, Senisterra G, Lepock J, McKee N. Effects of 4-h ischemia and 1-h reperfusion on rat muscle sarcoplasmic reticulum function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 281: 867–877.
- Uchiyama Y. Autophagy- physiology and pathophysiology. *Histochem cell bio*. 2008; 129(4) 407-20.
- Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martínez-Bello VE. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; 61(14): 1369-1374.

Vives-Bauza C, Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, Magrané J, Moore DJ, Dawson VL, Grailhe R, Dawson TM, Li C, Tieu K, Przedborski S. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 378–83.

Walker PM. Ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Ann Vasc Surg*. 1991; 5: 399–402.

Wang Y, Jiang YF, Huang QF, Ge GL, Cui W. Neuroprotective effects of salvia nolic acid B against oxygen-glucose deprivation/reperfusion damage in primary rat cortical neurons. *Chin Med J*. 2010; 23: 3612-2619.

Weiss DJ, Casale GP, Koutakis P, Nella AA, Swanson SA, Zhu Z, Miserlis D, Jason M. Oxidative damage and myofiber degeneration in the gastrocnemius of patients with peripheral arterial disease. *Journal of Translational Medicine*. 2013; 211- 230.

XIV FORUM da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascul ar – 2003. Isquemia crônica crítica das extremidades: controvérsias e atualização. *J. Vasc. Bras.*, Rio de Janeiro, 2, p.85-90, 2004.

Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12: 9–14.

Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain*. 2004; 127: 2153–2172.

Zhang GR, Zhao H, Cao H, Li X, Geller AI. Targeted gene transfer of different genes to pre synaptic and post synaptic neocortical neurons connected by a glutamatergic synapse. *Brain Res*. 2012; 14(1473):173-84.

**ANEXO**

## ANEXO A – Certificado



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do tratamento com N-acetilcisteína sobre dinâmica mitocondrial em modelo animal de isquemia crônica de membros inferiores", registrada com o protocolo nº 031/2016-1, sob a responsabilidade de Felipe Dal Pizzol, junto à equipe: Leandro Almeida da Silva, Monique Michels, Francieli Silva Vuolo - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 05/04/2016.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/2016 a 12/2016
Espécie/inhagem/raça	Rato heterogêneo Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	200-300g / 2 a 3 meses
Sexo	Masculino
Origem	Biotério da UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "N-acetylcysteine treatment effects on mitochondrial dynamics in an animal model with chronic lower limb ischaemia".


Protocol number: 031/2016-1

Principal Investigator: Felipe Dal Pizzol

Researchers: Leandro Almeida da Silva, Monique Michels, Francieli Silva Vuolo

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 05 de abril de 2016.

  
 Jairo José Zocche  
 Coordenador da CEUA