

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANDRESSA MANFREDINI SOLIZ ENCINAS

**O PAPEL DA DINÂMICA MITOCONDRIAL NA DISFUNÇÃO COGNITIVA EM
ANIMAIS SOBREVIVENTES A SEPSE**

CRICIÚMA

2019

ANDRESSA MANFREDINI SOLIZ ENCINAS

**O PAPEL DA DINÂMICA MITOCONDRIAL NA DISFUNÇÃO COGNITIVA EM
ANIMAIS SOBREVIVENTES A SEPSE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção de título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

CRICIÚMA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

E56p Encinas, Andressa Manfredini Soliz.
O papel da dinâmica mitocondrial na
disfunção cognitiva em animais sobreviventes a
sepsis / Andressa Manfredini Soliz Encinas. -
2019.
91 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo
Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.
Orientação: Felipe Dal Pizzol.

1. Dinâmica mitocondrial. 2. Disfunção
cognitiva. 3. Septicemia. 4. Autofagia. I.
Título.

CDD 23. ed. 616.944

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



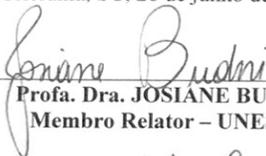
UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOCTORADO** apresentada pela candidata **Andressa Manfredini Soliz Encinas**, sob o título “**O PAPEL DA DINÂMICA MITOCONDRIAL NA DISFUNÇÃO COGNITIVA EM ANIMAIS SOBREVIVENTES A SEPSE**”, para obtenção do grau de **DOCTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 28 de junho de 2019.



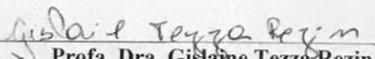
Prof. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator – UNESC



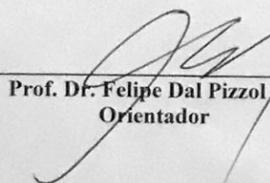
Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO
Membro Interno – UNESC



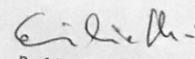
Prof. Dra. FABRICIA PETRONILHO
Membro Externo – UNISUL



Prof. Dra. Gislaime Tezza Rezin
Membro Externo – UNISUL



Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Orientador



Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador Adjunto do PPGCS
Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador Adjunto do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

Esta tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC, também no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS e no Laboratório Central Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso e ao Menino Jesus de Praga, a quem sou devota desde 1995.

A Dra. Marie Piazza por toda sua disponibilidade em me dar suporte em todos momentos que precisei nesses últimos anos. Você fez toda diferença para que essa Tese fosse concluída, o meu muito obrigada.

A minha filha Maria Fernanda, alegria e orgulho de minha vida.

Ao meu Professor Dr. Felipe Dal Pizzol pela confiança e acreditar que esta Tese é um excelente e promissor estudo.

Ao grupo de pesquisa do Fisiopat da UNESC, o meu muito obrigada.

Aos órgãos de fomento (CAPES, CNPq, FAPESC e UNESC), pela concessão da taxa/bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro necessário a execução dos experimentos que compõem esta tese.

“O que não me mata, me fortalece.”

Nietzsche

RESUMO

Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar o comprometimento cognitivo à longo prazo em sobreviventes à sepse. Sepse é considerada uma disfunção orgânica acompanhada de alta mortalidade. Entre estas disfunções, estão o dano cognitivo, resultante da Encefalopatia séptica (ES) à longo prazo que gera um impacto negativo na qualidade de vida dos sobreviventes. A presença de alterações na estrutura mitocondrial como um provável contribuinte para o comprometimento da encefalopatia e, como a recuperação da função mitocondrial impacta no desenvolvimento dessas disfunções ainda não é conhecida. Este estudo buscou avaliar o papel da dinâmica mitocondrial na disfunção cognitiva após sepse tardia. Para isso, foi utilizado o modelo animal de Ligação e Perfuração Cecal (CLP) para indução da sepse. Um grupo de animais foi tratado intracerebroventricularmente com rapamicina e rilmenidina, (fármacos ativadores dependente e independente da via mecanicista alvo da rapamicina -mTOR, reguladora da autofagia), do sétimo ao nono dia após a cirurgia, uma vez ao dia. Os animais foram mortos 24 horas, 3 e 10 dias após a sepse e, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram removidos para determinar parâmetros que avaliavam a dinâmica mitocondrial. Os resultados iniciais mostraram que a sepse foi associada com disfunção mitocondrial cerebral aguda (24 horas) e tardia (10 dias) com os níveis de adenosina trifosfato (ATP) e consumo de oxigênio *ex vivo* diminuídos. Marcadores da via da autofagia representados pelas proteínas relacionadas a via da autofagia (ATG) - ATG 16, ATG 12, ATG 7, ATG 5, Beclina, proteína de cadeia leve (LC3 A/B) e marcadores da via da mitofagia (PINK/Parkin), bem como o conteúdo das proteínas mitocondriais (Mn-SOD e COX) não foram regulados durante esses tempos. Contudo, após tratamento com os ativadores da autofagia, os níveis cerebrais de ATP (adenosina trifosfato) e o consumo de oxigênio *ex vivo* no hipocampo e córtex pré-frontal reverteram a redução, sugerindo uma melhora na função mitocondrial. Assim como os ativadores da autofagia reverteram atividades de complexos (I, II, II-III) e das enzimas do ciclo de Krebs (citrato sintase e succinato desidrogenase), principalmente, no córtex pré-frontal. A carbonilação de proteínas apresentou melhora do dano oxidativo induzido pelo CLP após o tratamento com rapamicina. Além disso, a rapamicina foi capaz de reverter a redução da razão mtDNA/gDNA, que esteve de acordo com as imagens da ultraestrutura da mitocôndria, reduzindo o edema mitocondrial após tratamento. Finalmente, mesmo com o comprometimento cognitivo à longo prazo observado em animais sobreviventes à sepse tardia os ativadores de autofagia foram capazes de melhorar o déficit

cognitivo após tratamento. Em conclusão, o comprometimento da função cerebral a longo prazo está temporariamente relacionado à disfunção mitocondrial. Ativadores de autofagia mitocondrial mediante a restauração da função mitocondrial e consequente melhora do metabolismo energético, poderiam recuperar animais com comprometimento cognitivo sobreviventes ao modelo CLP.

Palavras-chave: autofagia; disfunção cerebral; disfunção mitocondrial; sepse.

ABSTRACT

Several different mechanisms have been proposed to explain long-term cognitive impairment in sepsis survivors. Sepsis is considered an organic dysfunction accompanied by high mortality. Among these dysfunctions are the cognitive damage resulting from long-term septic encephalopathy (ES) that has a negative impact on the quality of life of survivors. The presence of alterations in the mitochondrial structure as a likely contributor to the encephalopathy impairment and, as the recovery of mitochondrial function has an impact on the development of these dysfunctions is not yet known. This study aimed to evaluate the role of mitochondrial dynamics in cognitive dysfunction after late sepsis. For this, the animal model CLP (Cecal ligation and perforation) was used for induction of sepsis. One group of animals was treated intracerebroventrically with rilmenidine or rapamycin, which are independent activating drugs and dependent on the mTOR pathway, the main regulator of autophagy activation, once daily, from the seventh to the ninth postoperative day. The animals were killed 24 hours, 3 and 10 days after sepsis, and the hippocampus and prefrontal cortex were removed to determine mitochondrial function. Initial results showed that sepsis was associated with acute (24-hour) and late (10-day) brain mitochondrial dysfunction with decreased adenosine triphosphate (ATP) levels and ex vivo oxygen consumption. The autophagy pathway represented by the proteins (ATG 16, ATG 12, ATG 7, ATG 5, Beclina and LC3 A / B) and mitofagia (PINK / Parkin), as well as mitochondrial proteins content (Mn-SOD and COX) were not regulated during those times. However, after treatment with autophagy activators, brain ATP levels and ex vivo oxygen consumption in the hippocampus and prefrontal cortex reversed the reduction, suggesting an improvement in mitochondrial function. The autophagy activators reversed the activities of some complexes (I, II, I-II) and the enzymes of the Krebs cycle (citrate synthase and succinate dehydrogenase), mainly in the prefrontal cortex. Carbonylation of proteins showed improvement in PFa induced oxidative damage after treatment with rapamycin. In addition, rapamycin was able to reverse the reduction of the mtDNA / gDNA ratio, which was in agreement with the mitochondrial ultrahigh-resolution images, reducing mitochondrial edema after treatment. Finally, even with the long-term cognitive impairment observed in animals surviving late sepsis, autophagy activators were able to improve cognitive deficit after treatment. In conclusion, long-term impairment of brain function is temporally related to mitochondrial dysfunction. Activators of mitochondrial autophagy through the restoration of mitochondrial function and consequent

improvement of energy metabolism could recover animals with cognitive impairment surviving CLP model.

Keywords: autophagy; brain dysfunction; mitochondrial dysfunction; sepsis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fisiopatologia da sepse	26
Figura 2: Estrutura da mitocôndria.....	30
Figura 3: Síntese de ATP.	31
Figura 4: Representação esquemática das etapas de formação dos autofagossomos e de proteínas e vias relacionadas com o processo autofágico.....	39
Figura 5: Modelo experimental de sepse abdominal por peritonite fecal (CLP).	47
Figura 6: Desenho Experimental	48
Figura 7: Teste da esquia inibitória.....	51
Figura 8: Teste de reconhecimento de objetos.....	52
Figura 9: A evolução da função mitocondrial no cérebro durante o desenvolvimento da sepse	59
Figura 10: Conteúdo da SOD2 e COX no cérebro durante a evolução da sepse	60
Figura 11: Expressão proteica dos marcadores de autofagia durante o desenvolvimento da sepse.....	61
Figura 12: Expressão proteica dos marcadores da via da autofagia envolvidas na pré-formação e formação da estrutura autofagossômica durante o desenvolvimento da sepse	62
Figura 13: Quantificação gênica de marcadores de mitofagia durante o desenvolvimento da sepse.....	63
Figura 14: Efeito de ativadores da autofagia na função mitocondrial cerebral após sepse tardia	64
Figura 15: O efeito de ativadores da autofagia mitocondrial nas atividades cerebrais nas atividades dos complexos (I, II, II-II e IV) da cadeia respiratória após sepse tardia.....	65
Figura 16: O efeito de ativadores da autofagia mitocondrial nas atividades cerebrais das enzimas do ciclo de Krebs no cérebro após sepse tardia	66
Figura 17: Efeito do tratamento com ativadores da autofagia em dano oxidativo em proteínas após sepse tardia	67
Figura 18: O efeito de ativadores de autofagia mitocondrial no genoma cerebral na sepse tardia	68
Figura 19: O efeito de ativadores de autofagia mitocondrial nas mitocôndrias cerebrais na sepse tardia	69

Figura 20: O efeito de ativadores de autofagia mitocondrial em déficits cognitivos à longo prazo em sobreviventes à sepse 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos no Protocolo I.....	71
Tabela 2: Resumo dos resultados obtidos no Protocolo II.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
ATG	Proteína relacionada a autofagia (do inglês <i>Autophagy-related protein</i>)
ANOVA	Análise da Variância (do inglês, <i>Analysis of variance</i>)
BECN1	Beclina-1 (do inglês <i>Beclin-1</i>)
Ca	Cálcio
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica (do inglês, <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CAT	Catalase
CONCEA	Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal
Cox-2	Ciclo-oxigenase-2
COX	Citocromo C Oxidase
Cu ⁺²	Íon de Cobre
DAMP	Padrões Moleculares Associados à Danos (do inglês <i>danger-associated molecular patterns</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
mtDNA	Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
gDNA.	Ácido Desoxirribonucleico genômico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ES.	Encefatopatia Séptica
FAD	Dinucleótido de Flavina Adenina
Fe ⁺³	Íon de Ferro
GPx	Glutationa peroxidase (do inglês, <i>glutathione peroxidase</i>)
GR	Glutationa redutase (do inglês, <i>glutathione reductase</i>)
GSH	Glutationa Reduzida (do inglês <i>glutathione</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto De Hidrogênio
HClO	Ácido Hipocloroso
I.C.V	Intracerebroventricular

I.V	Intravenoso
IL-1	Interleucina-1
IL-1 α	Interleucina-1 Alfa
IL-1 β	Interleucina-1 Beta
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido Nítrico Induzível (do inglês, <i>inducible nitric oxid synthase</i>)
LC3	Cadeia leve 3 da proteína associadas a microtúbulos 1A/1B (do inglês <i>MAP1LC3 – Microtubule -associated proteins 1A/1B light chain 3</i>)
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LPS	Lipossacarídeo
MDA	Malondialdeído
Mn-SOD	Superóxido dismutase dependente de manganês (do inglês, <i>superoxide dismutase</i>)
MMP	Metaloproteinase de Matriz (do inglês, <i>Matrix Metalloproteinase</i>)
MPO	Mieloperoxidase (do inglês, <i>Myeloperoxidase</i>)
MST	3-Mercaptopiruvato Sulfotransferase
mTOR	mecanismo alvo da rapamicina (do inglês <i>targets of rapamycin</i>)
mTORC1	mecanismo do complexo 1 alvo da rapamicina (do inglês mTOR Complex 1)
Na ₂ S	Sulfeto de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida
NADPH	Fosfato Dinucleótido de Nicotina e Adenina (do inglês <i>nicotine dinucleotide phosphate and adenine</i>)
NaHS	Hidrossulfeto de sódio
NAC	N-acil cisteína
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B (do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartato (do inglês <i>N-methyl-D-aspartate</i>)
NO	Óxido Nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato

NOS	Óxido nítrico sintetase
NOX	Nitrito/nitrato
O ₂ [•]	Ânion Superóxido
OH [•]	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Radical Peroxinitrito
PAF	Fator de Ativação de Plaquetas (do inglês, <i>Platelet Activating Factor</i>)
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês, <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>)
PINK	(do inglês <i>PTEN-induced putative kinase</i>)
PGC-1 α	Receptor do coativador alfa 1 gama do peroxissoma (do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha</i>)
PPAR	Receptor Proliferador de Peroxissoma (do inglês, <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>)
PRRs	Padrão de Reconhecimento Padrão (do inglês, <i>Pattern Recognition Receptors</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SPSS	Pacote Estatístico para Ciências Sociais (do inglês <i>Statistical Package For The Social Science</i>)
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês, <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TFAM	(do inglês <i>Transcription fator A mitochondrial</i>)
TLRs	Receptores Semelhantes a Toll (do inglês <i>Toll-like receptors</i>)
TNFR1	Receptor de Fator de Necrose Tumoral-1 (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor-1</i>)
TNF- α	Fator De Necrose Tumoral Alfa (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>)
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
URGS	Univesidade do Rio Grande do Sul
UNESC	Universidade do Extremo Sul Catarinense
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 SEPSE	21
1.1.1 Definição e Classificação.....	21
1.1.2 Aspectos Epidemiológicos	22
1.1.3 Fisiopatologia da Sepse	24
1.2 MITOCÔNDRIA.....	28
1.2.1 Genoma mitocondrial.....	31
1.3 ENCEFALOPATIA SÉPTICA E A DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	33
1.4 O PAPEL DA AUTOFAGIA NA DINÂMICA MITOCONDRIAL	36
1.5 MODULAÇÃO DA AUTOFAGIA MITOCONDRIAL.....	40
2 JUSTIFICATIVA	44
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVOS GERAIS	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	46
4.2 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE E TRATAMENTOS.....	46
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL	47
4.3.1 Protocolo I.....	48
4.3.2 Protocolo II.....	49
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	50
4.4.1 Esquiva inibitória.....	50
4.4.2 Reconhecimento de objetos.....	51
4.5 AVALIAÇÃO DA DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL FRENTE AO INSULTO SÉPTICO E PÓS ESTIMULAÇÃO DE AUTOFAGIA.....	52
4.5.1 Consumo <i>ex vivo</i> de oxigênio.....	52
4.5.2 Níveis de ATP.....	53
4.5.3 Expressão do conteúdo de proteína mitocondrial e dos ativadores da autofagia/mitofagia por <i>Western Blotting</i>.....	53
4.5.4 Dano oxidativo.....	54
4.5.5 Proteínas.....	54

4.5.6 Atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial.....	54
4.5.7 Atividade das enzimas do Ciclo de Krebs.....	55
4.5.8 Análise molecular da razão de DNA mitocondrial total/DNA genômico por <i>Turbized</i>	55
4.5.9 Análise ultra estrutural das mitocôndrias por microscopia eletrônica de transmissão.....	56
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICA.....	56
5 RESULTADOS	58
5.1 A FUNÇÃO MITOCONDRIAL É COMPROMETIDA NO SNC DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA SEPSE.....	58
5.2 A DINÂMICA MITOCONDRIAL NÃO É REGULADA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA SEPSE.....	60
5.3 ATIVADORES DA AUTOFAGIA MITOCONDRIAL MELHORAM A FUNÇÃO MITOCONDRIAL APÓS SEPSE TARDIA	63
5.4 ATIVADORES DA AUTOFAGIA MITOCONDRIAL MELHORAM A OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS APÓS SEPSE TARDIA.....	67
5.4 ATIVADORES DE AUTOFAGIA MELHORAM O DÉFICIT COGNITIVO À LONGO PRAZO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE.....	69
5.5 RESUMO DOS RESULTADOS BIOQUÍMICOS, IMUNOQUÍMICOS, MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS	70
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS	93
ANEXO A – CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA REFERENTE AO PROTOCOLO I.....	94
ANEXO B – CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA REFERENTE AO PROTOCOLO II.....	95
ANEXO C – REPRESENTAÇÃO DOS <i>WESTERN BLOTTING</i> DAS PROTEÍNAS DA VIA DA AUTOFAGIA/MITOFAGIA	96

1 INTRODUÇÃO

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica à presença de um agente infeccioso resultando em uma disfunção orgânica com risco de vida (Singer et al., 2016). A inflamação é uma resposta normal do sistema imune quando há uma infecção, porém na sepse, esse processo inflamatório é exacerbado ocasionando a síndrome de insuficiência de múltiplos órgãos e em muitos casos, a morte do paciente (Dellinger et al., 2013; Abraham et al., 2016).

Os neurônios são altamente dependentes de oxigênio. A cooperação metabólica entre células gliais e neurônios para a recaptação de neurotransmissores, defesa contra o estresse oxidativo e liberação do substrato dependem criticamente da disponibilidade de energia (Johri e Beal., 2012). Disfunção mitocondrial é definida como a inabilidade da mitocôndria de produzir e manter níveis suficientes de ATP, através de fosforilação oxidativa (FOX) em resposta às demandas energéticas (Montgomery e Turner, 2015). Neste contexto, a normalidade da função mitocondrial é vital para a manutenção da função cerebral. Dano a cadeia de transporte de elétrons é um fator importante na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas (Johri e Beal, 2012) e é observada nos estágios iniciais da sepse (Palikaras et al., 2015).

Dentre as anormalidades fisiológicas, as alterações na função e na dinâmica mitocondrial merecem destaque, uma vez que a homeostase da organela é essencial para a viabilidade e o bom funcionamento do fornecimento energético celular. Nos últimos anos, a mitocôndria tem sido envolvida na participação de diversos eventos relacionados à comunicação celular, com papel integrador e em resposta a vários estressores (Marin-Garcia e, Goldenthal 2004; West, 2011; Johri e Beal., 2012; Harris., 2017). A mitocôndria apresenta um importante papel na fisiologia celular além de sua função no metabolismo energético. O correto funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial garante baixas tensões de oxigênio intracelular, evitando oxidações indesejáveis. Finalmente, a mitocôndria contém uma variedade de proteínas envolvidas na regulação da morte celular, um processo que depende de energia (Wallace, 1999).

A homeostase mitocondrial é regulada pela dinâmica mitocondrial, incluindo os processos de autofagia, mitofagia e biogênese mitocondrial (Palikaras et al., 2015). A autofagia recicla organelas redundantes, não essenciais ou danificadas, e componentes macromoleculares (Harris e Rubinstein., 2012). As proteínas que regulam a dinâmica mitocondrial estão intimamente envolvidas na autofagia (Harris e Rubinstein., 2012). Da

mesma forma, duas proteínas, quinase 1 induzidas por proteínas (PINK1) e Parkin, desempenham papéis importantes na mitofagia e controle da qualidade mitocondrial (Bingol e Sheng, 2016). Mitofagia é um processo pelo qual as mitocôndrias são direcionadas para ser alvo de degradação através da via da autofagia (Narendra et al., 2008). Por sua vez, a biogênese mitocondrial engloba uma série de etapas que busca a regulação do conteúdo mitocondrial e sua morfologia, incluindo a coordenação da expressão, importação e genomas nucleares e mitocondriais (Perez-Pinzon et al., 2012; Gunst., 2017). Também representa um mecanismo importante através do qual a regulação da capacidade mitocondrial pode ocorrer durante a falência de múltiplos órgãos e sua fase de recuperação (Carré et al., 2010).

Estudo demonstrou que as consequências a longo prazo após a recuperação da sepse geralmente incluem danos neurológicos, do tipo isquemia cerebral, alterações metabólicas e neuroinflamação (Annane e Sharchar., 2015). Em animais submetidos a sepse, mesmo após a recuperação completa, demonstrou-se o comprometimento significativo das tarefas comportamentais, indicando déficits cognitivos (Barrichello et al., 2005; Semmler., 2013). Em pacientes recuperados, observa-se déficits cognitivos persistentes (Schmidt et al., 2016), o que pode estar associado a prejuízos de longa duração nas capacidades cognitivas (Semmler., 2013). Dada a importância em suas funções, não é surpreendente constatar que a integridade e funcionalidade da mitocôndria pode afetar a viabilidade celular. Nesse contexto, a correta função mitocondrial é vital para a manutenção da função cerebral garantindo assim energia suficiente para a integridade celular.

1.1 SEPSE

1.1.1 Definição e Classificação

A sepse pode ser definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada à infecção. Já o choque séptico é definido como sepse acompanhada de anormalidades vasculares/celulares e metabólicas que podem aumentar a taxa de mortalidade (Abraham, 2016; Singer, 2016).

Os critérios clínicos para o diagnóstico de sepse são: suspeita ou certeza de infecção e aumento agudo de dois ou mais pontos no escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) em resposta à infecção (representando disfunção orgânica). Para o choque séptico, os critérios clínicos são: sepse associada a necessidade de vasopressor para elevar a

pressão arterial média acima de 65mmHg e lactato maior que 2mmol/l (18mmol/dl) após a reanimação volêmica adequada (Abraham., 2016; Singer et al., 2016).

A sepse pode estar associada a manifestações sistêmicas gerais, traduzidas por respostas inflamatórias, macro e micro-hemodinâmicas, além das disfunções de órgãos (Dellinger., 2013; Singer et al., 2016. Mais recentemente, foi redefinido o conceito de sepse e choque séptico, com ênfase em determinar a presença de disfunção de órgãos, o que levaria a um maior risco de mortalidade, do que simplesmente uma infecção associada a Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), que pode refletir apenas uma inapropriada resposta do hospedeiro, frequentemente adaptativa. Esta nova visão é consistente com o fato de que os defeitos celulares alicerçam síndromes fisiológicas e bioquímicas em sistemas de órgãos específicos (Abraham., 2016; Singer et al., 2016).

1.1.2 Aspectos Epidemiológicos

A incidência mundial da sepse está situada em torno de 19 milhões de casos ao ano, bem como entre as principais causas de óbito em Unidades de Terapia Intensiva (UTI's), a mesma representa uma incidência de 30%, com taxa de mortalidade de 25 a 50% (Angus e Van der Poll, 2013; Zhou et al., 2014).

No Brasil, esta taxa chega a superar 70%, o que, provavelmente, se correlaciona ao acesso dos pacientes a centros de atendimento precário (Taniguchi et al., 2014). A incidência global da síndrome é cada vez maior, se relacionando a vários fatores, dentre eles, o envelhecimento da população, assim como o aumento de doenças crônicas, quimioterapia, procedimentos invasivos, transplantes e uso de imunossupressores (Mayr et al., 2014). De 2006 a 2015, a incidência anual de sepse aumentou 50,5% de 31,5/100.000 para 47,4/100.000 pessoas (Quintano Neira et al., 2018).

Há de se considerar que, com o aumento da incidência (Hotchkiss e Karl., 2003), a sepse vem adquirindo uma crescente importância, seja pela melhoria do atendimento de emergência, uma vez que mais pacientes graves sobrevivam ao insulto inicial; seja pelo aumento da população idosa e de pacientes imunossuprimidos, originando um grupo populacional susceptível ao aparecimento de infecções graves. Uma outra questão relevante é o aumento da resistência bacteriana, contribuindo ainda mais para esse crescente aumento, tornando um problema de saúde pública (Angus et al., 2001; Lagu et al., 2012; Mayr et al., 2014).

O dano cognitivo à longo prazo vem sendo relatado como uma seqüela de sepse (Gunther et al., 2012; Semmler et al., 2013). Estudo mostra que a prevalência de dano cognitivo moderado a grave é 10,6% maior em pacientes sobreviventes de sepse grave (Iwashyna et al., 2010). Estudos clínicos demonstraram que pacientes que sobreviveram a sepse apresentaram comprometimento cognitivo à longo prazo, incluindo alterações na memória, atenção, concentração e/ou prejuízo global da função cognitiva, além de perda de qualidade de vida (Angus et al. 2001; Rothenhausler et al. 2001; Granja et al. 2004; Hopkins et al. 2004; Iwashyna et al. 2010; Prescott e Angus., 2018).

Estudos estimaram que a sepse pode estar associada ao desenvolvimento de até 20.000 novos casos de comprometimento cognitivo moderado a grave nos EUA (Angus et al. 2001; Iwashyna et al. 2010). Esses efeitos de longo prazo podem estar associados a complicações na fase aguda (ex. *delirium* e ES) e a fatores de risco prévio dos pacientes. Após a hospitalização, os pacientes podem ter prejuízos a longo prazo na memória, atenção, fluência verbal (Annane e Sharshar., 2015). Em um estudo observacional de 516 participantes do Estudo de Saúde e Aposentadoria dos EUA que sobreviveram a uma hospitalização com sepse, a prevalência de comprometimento cognitivo moderado a grave aumentou de 6,1% antes da hospitalização para 16,7% após a hospitalização (Iwashyna et al., 2010) Em outro estudo mais recente, foi observado uma redução de mortalidade, decorrente da sistematização do tratamento da sepse (Kaukonen et al., 2014).

Esse comprometimento cognitivo à longo prazo tem sido observado tanto em pacientes jovens quanto em idosos. Os pacientes mais velhos, no entanto, especialmente com distúrbios neurológicos pré-existentes, parecem ser mais suscetíveis a um declínio rápido e permanente (Lemay et al., 2014). Embora o potencial de sequelas significativas seja preocupante, as estratégias para evitar o prejuízo cognitivo ou promover uma efetiva recuperação funcional ainda são escassos (Shah et al., 2013).

Outro estudo demonstrou que sobreviventes de sepse apresentavam déficits no aprendizado verbal e na memória, além de reduções significativas no volume do hipocampo esquerdo comparados com controles saudáveis em exames de ressonância magnética de crânio (Semmler et al., 2013). Pandharipande e colaboradores (2013), relataram os resultados de um estudo multicêntrico, prospectivo de coorte, que avaliou os resultados cognitivos à longo prazo em uma população mista de pacientes críticos. Os achados do estudo mostram que a doença crítica está associada a déficits cognitivos clinicamente relevantes, independentemente da idade, da presença de comorbidades ou do diagnóstico de admissão.

Além disso, a presença de disfunção cerebral aguda, diagnosticada como *delirium*, durante a hospitalização na UTI foi fortemente associada a um maior comprometimento cognitivo.

Sabe-se que pacientes que sobrevivem a sepse têm uma trajetória de saúde diferente da população em geral. Os pacientes, quando sobreviventes da sepse, desenvolvem complicações decorrentes do próprio processo de saúde-doença, das medidas terapêuticas necessárias ao tratamento, bem como do prolongado período de internação. Além disso, a taxa de mortalidade pós-alta desses pacientes é elevada, não sendo explicada por possíveis eventuais doenças de base presentes, muitas vezes, antes do evento séptico (Winters et al., 2010). Por essa razão, entre outras acima citadas, a relação causal das consequências da sepse e da disfunção mitocondrial com consequente disfunção cognitiva à longo prazo ainda está longe de ser elucidada. Entende-se que a compreensão dos processos metabólicos que levam à morbidade à longo prazo é essencial para o desenvolvimento de medidas preventivas e terapêuticas em pacientes com encefalopatia associada a sepse.

1.1.3 Fisiopatologia da Sepse

A fisiopatologia da sepse envolve a interação complexa entre o hospedeiro e o agente etiológico. Segundo um estudo de revisão realizado por Bozza e colaboradores vários mecanismos têm sido propostos e incluem disfunção mitocondrial e vascular, dano oxidativo, distúrbios de neurotransmissores, neuroinflamação e morte celular. Além disso, a resposta imune a sepse, especialmente a produção de mediadores inflamatórios, tem consistentemente se mostrado relacionada ao estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e falência orgânica que caracterizam a própria fisiopatologia (Dellinger, 2013; Singer, 2016).

A resposta imune é iniciada pela presença de um patógeno invasor e não retorna à homeostase, culminando assim em uma síndrome patológica caracterizada por inflamação excessiva sustentada e supressão imune (Angus e Van der Poll, 2013). Os patógenos ativam as células imunológicas por meio de uma interação com receptores de reconhecimento padrão (PRRs), denominados de padrão molecular associado a patógeno (PAMPs). Esses receptores reconhecem estruturas que estão ligadas a espécies microbianas, que resultam na regulação positiva da transcrição gênica inflamatória e ativação da imunidade inata (Cinel e Dellinger, 2007). O padrão molecular associado ao dano (DAMPs), por sua vez, envolvem substâncias endógenas produzidas ou liberadas por células mortas ou lesadas por infecções (Triantafilou, 2002). DAMPs podem também ser um indicativo de lesões celulares assépticas provocadas

por queimaduras, toxinas, traumas, entre outras. As moléculas de PAMPs e DAMPs são reconhecidas por PRRs e expressas por fagócitos que se ligam a eles. Esta ligação dá início a diversos eventos que culminam na eliminação do agente etiológico. Dessa forma, os PAMPs são reconhecidos por PRRs encontrados em células do sistema imune inato como os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Entre os PRRs, os mais importantes são da família dos receptores toll-like (TLRs), encontrados principalmente, na membrana de células mononucleares fagocíticas. A ativação destes receptores desencadeia diversas respostas celulares por meio de vias de transdução de sinal, levando a produção de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios que participam da resposta imune contra o invasor (Triantafilou., 2002).

Uma das principais ligações de PAMPs e PRRs é a interação do lipopolissacarídeo gram-negativo (LPS) com o TLR4 com a finalidade de coordenar uma resposta defensiva envolvendo componentes celulares. Tal interação libera uma variedade de moléculas sinalizadoras, como as prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas, desencadeando a cascata de inflamação e, por fim, culminando com o recrutamento de leucócitos para o local de infecção, o que representa uma das principais funções da resposta imune (Triantafilou., 2002).

A inflamação pode causar lesão no endotélio vascular, acompanhada de morte celular e perda da integridade da barreira hematoencefálica dando origem a edema subcutâneo e cavidades corporais (Goldenberg et al., 2011). Paralelamente, há uma interação de outros componentes infecciosos, imunológicos, endócrinos, cardiovasculares e inclusive genéticos que tendem a coordenar uma resposta inflamatória exacerbada do organismo, trazendo para o sítio da infecção diversos mediadores inflamatórios com consequentes alterações fisiológicas. Essa interação mediada pelo sistema imune envolve os mecanismos humorais e celulares que atenuam os efeitos da resposta pró-inflamatória (Van der Poll e Opal., 2008).

O impacto da inflamação na função mitocondrial tem sido frequentemente modelado pela exposição à endotoxina bacteriana; já no final dos anos 60, sabia-se que a exposição a LPS diminuía a respiração celular, tanto na mitocôndria isolada (Harris et al., 1968; Schumer et al., 1970) Modelos animais de sepse bacteriana confirmaram que a função mitocondrial e / ou perfis metabólicos também são significativamente afetados pela inflamação séptica, com as alterações mais profundas tipicamente observadas no início da resposta do hospedeiro (Brealey et al., 2002; Levy et al., 2004; Lee et al., 2014). Finalmente, no modelo mais relevante, em pacientes humanos com sepse de vários patógenos e fontes, há

evidências de disfunção mitocondrial pró-inflamatória (Figura 1). É importante ressaltar que o grau de disfunção mitocondrial parece estar associado a resultados clínicos, com os não sobreviventes de sepse grave demonstrando uma diminuição precoce da proporção ATP / ADP no músculo esquelético (Brealey et al., 2002), posteriormente, uma falha indução da regulação positiva de marcadores de biogênese mitocondrial quando comparados aos sobreviventes (Carre et al., 2010).

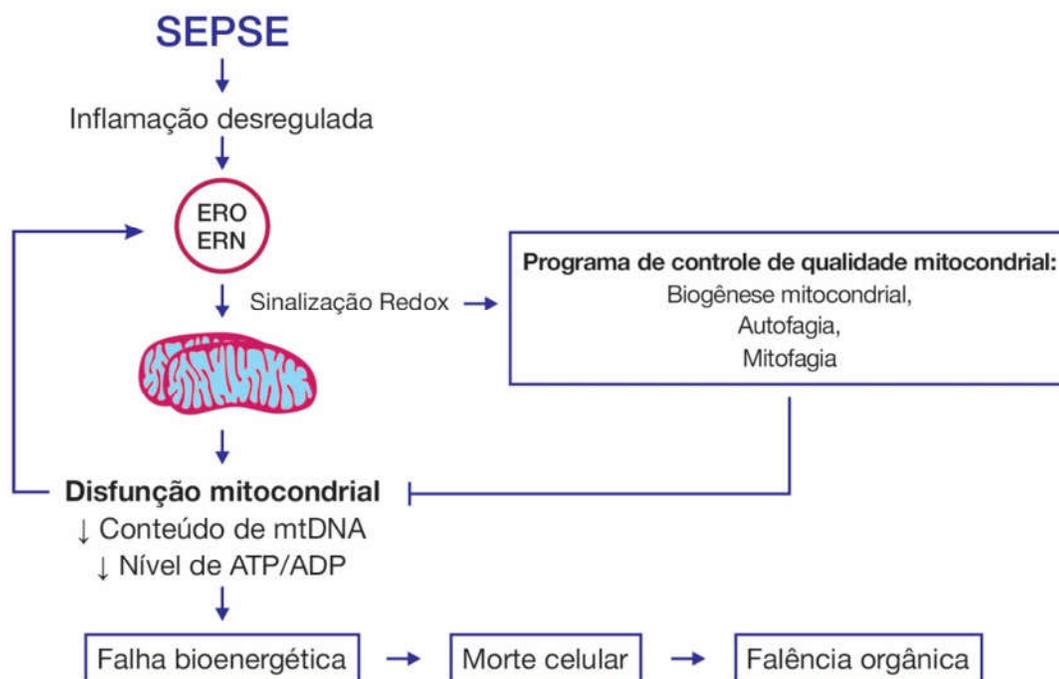


Figura 1: Espécies reativas de oxígénio e nitrogénio induzidas por inflama&eacil;o modulam os programas de controle de qualidade mitocondrial por meio de sinaliza&eacil;o redox. Níveis mais altos de estresse oxidativo tamb&eacil;m podem contribuir para a disfun&eacil;o mitocondrial inflamatória, resultando em falha energ&eacil;tica e morte celular. DNA mitocondrial (mtDNA); espécies reativas de oxígénio (ROS); espécies reativas de nitrogénio (ERN). Fonte: Adaptado de Cherry e Piantadosi., 2016).

Outro componente precoce na patog&eacil;nese da sepse é a ativa&eacil;o da micróglia (Van Gool et al., 2010). A ativa&eacil;o da micróglia, que pode ser mediada por LPS e citocinas, leva a secre&eacil;o de mediadores excitotóxicos como glutamato e interleucinas. Os fen&otipos desenvolvidos pela micróglia ativada podem ser pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, com efeitos neurotóxicos ou neuroprotetores. Al&eacil;m disso, sua ativa&eacil;o pode levar ao aumento da demanda metabólica, resultando em desequilíbrio energ&eacil;tico e disfun&eacil;o mitocondrial (Mazeraud et al., 2016). Por consequ&eacil;ncia, a disfun&eacil;o mitocondrial lesa as mitoc&oacil;ndrias que acabam por liberar as enzimas no ambiente extracelular que podem ativar os neutrófilos e causar mais les&oacil;es teciduais (Zhang et al., 2010). Como consequ&eacil;ncia dos mecanismos

supracitados ocorre um desequilíbrio bioenergético. Esse desequilíbrio se caracterizaram pela perda de potencial de membrana mitocondrial, redução da utilização de oxigênio e da capacidade de síntese de ATP acabam por acentuar ainda mais o dano mitocondrial após o desenvolvimento da sepse (d'Avila et al., 2008; Japiassu et al., 2011).

Um estudo mais recente, mostrou que o aumento da captação de glicose pelo cérebro faz parte desta adaptação metabólica ao processo inflamatório. Além disso, a expressão e atividade aumentadas da NADPHox parece contribuir de maneira significativa para dano oxidativo, neuroinflamação e consequente déficit cognitivo em animais sobreviventes de sepse (Hernandes et al., 2014).

Estudos experimentais demonstraram evidências de estresse oxidativo nas primeiras horas após a sepse, podendo contribuir para o aparecimento de dano oxidativo agudo e a longo prazo (Barrichello et al., 2008; Comim et al., 2008; Streck., 2008). ERO são um tipo de radicais livres, que nada mais são do que moléculas instáveis por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados (Devlin e Michelacci., 2003). Tais espécies reativas são derivadas da redução parcial do oxigênio molecular ao reagirem com outras moléculas orgânicas, levando à morte celular neuronal. Quando em baixas concentrações, atuam em processos celulares de defesa contra agentes patogênicos (Semmler et al., 2005).

Entre as ERO estão o ânion superóxido (O_2^-), os radicais peróxidos (ROOH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (Lee et al., 2013). Entre as ERN encontra-se o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o óxido nítrico (NO) (Andrades., 2009; Berg et al., 2011) Essa produção excessiva pode danificar o tecido do hospedeiro, levando a danos mitocondriais e a consequente falência orgânica. Além disso, os efeitos pró-inflamatórios da ERO incluem danos endoteliais, aumento das citocinas e o comprometimento mitocondrial (Andrades et al., 2011).

Sabe-se que em condições fisiológicas, a produção das ERO é balanceada pelo sistema de defesa antioxidante no organismo. Alguns mecanismos envolvidos na progressão da sepse estão ligados ao desequilíbrio entre a produção de EROs e a sua degradação por substâncias antioxidantes. Quando essa produção de ERO é maior que a resposta antioxidante ocorre o estresse oxidativo, causando danos e até a morte celular (Andrades et al., 2009; Galley., 2011).

Os mecanismos de defesa contra o excesso de radicais livres estão associados a atividade antioxidante de enzimas como a enzima superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) (De Menezes et al., 2009). O Sistema Nervoso Central

(SNC) é susceptível a tais efeitos do estresse oxidativo, uma vez que possuem ácidos graxos poliinsaturados que são alvos das ERO e possuem baixas concentrações de antioxidantes (De Menezes et al., 2009; Sankowski, 2015). Neste sentido, a disfunção cerebral na sepse pode estar comprometida a nível de alterações metabólicas na circulação cerebral, efeitos dos mediadores inflamatórios e produção de ERO (Dal-Pizzol et al., 2010).

1.2 MITOCÔNDRIA

Nos últimos anos, a mitocôndria tem sido implicada na participação de diversos eventos relacionados à comunicação celular, com papel integrador, em resposta a vários estressores (Goldenthal e Marin-Garcia, 2004; West, 2011). Desempenham uma infinidade de funções em diversos eventos celulares como apoptose, homeostase de cálcio e degradação de ácidos graxos, mas a sua principal atividade é a produção de energia na forma de ATP (Schon et al., 2012).

A mitocôndria (Figura 2) (mitos, filamento e condria, partícula) é uma organela intracelular e composta por cerca de 1.500 polipeptídeos, sendo a maioria codificada pelo DNA nuclear (nDNA). No entanto, dos cerca de 80 polipeptídeos envolvidos na cadeia respiratória, 13 são codificados na própria mitocôndria pelo mtDNA (Chiaratti et al., 2011). Dependendo do tecido e estado metabólico em que se encontra, seu diâmetro fica em torno de 0,2 a 1 μ M, e possui duas membranas. A membrana externa, de menor superfície, é composta por fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, sendo muito mais pobre em colesterol e esfingomielina que a membrana plasmática. Por sua vez, a membrana interna é composta por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipina (Daum, 1985; Daum e Horvath, 2013). Esta membrana interna é rica em proteínas e nela se encontram os componentes da cadeia respiratória, assim como a ATP sintase, que realizam a fosforilação oxidativa. No seu interior ou matriz mitocondrial localizam-se as enzimas do ciclo de Krebs também conhecido como ciclo do ácido cítrico, β -oxidação de ácidos graxos, do metabolismo do piruvato, RNAs, ribossomos e mtDNA. O espaço entre as membranas é também de grande importância fisiológica uma vez que se encontram as enzimas com funções do metabolismo energético, como o citocromo c, citrato sintase e succinato desidrogenase (Daum, 1985; Daum e Horvath, 2013).

Sabe-se que as mitocôndrias são a principal fonte de ATP celular como também a principal produtora de ERO. Há uma grande probabilidade de que a disfunção mitocondrial,

como já documentado em casos de sepse contribui significativamente para a morbidade e mortalidade no contexto clínico (Coopersmith et al., 2002).

Além do seu papel na produção de ATP, as mitocôndrias também desempenham um papel importante na homeostase de cálcio, metabolismo hormonal, termoregulação, produção de ERO, ERN, sinalização celular e principais reguladores de apoptose e morte celular. Em órgãos vitais como o cérebro, o dano mitocondrial induzido pela sepse, tende a interromper a fosforilação oxidativa causando vários níveis de incapacidade bioenergética e consequente estresse oxidativo. A mitocôndria parece ser a principal fonte de ERO, e cerca de 2% do oxigênio consumido é convertido em ânion superóxido, considerado a primeira etapa da formação das ERO (Koppers et al., 2008). Neste contexto, as células estão programadas a remover mitocôndrias disfuncionais, velhas ou danificadas e substituí-las à longo prazo pelo processo reciclagem chamado de autofagia. No entanto, quando o dano mitocondrial é demasiado, vários gatilhos levam a apoptose ou necrose que podem contribuir para o comprometimento de órgãos vitais (Scaffidi et al., 2002). Com propósito de explorar novas vias mitocondriais que possam controlar ou mediar esses gatilhos, novos alvos terapêuticos já começaram a serem estudados (Murphy et al., 2016; Brown et al., 2017; Zhang et al., 2018; Hill et al., 2019; Crouser et al; 2006).

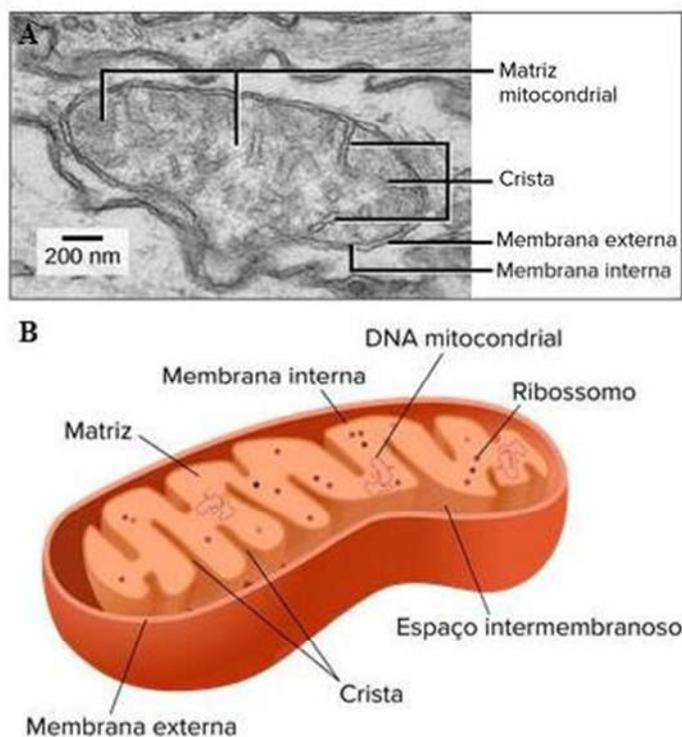


Figura 2: Estrutura da mitocôndria. Imagem de microscopia eletrônica de uma mitocôndria (A) e imagem ilustrativa (B), contendo a identificação e localização das principais estruturas da organela. Adaptado de Chiaratti et al., 2011.

As mitocôndrias estão intimamente ligadas à homeostase celular pois, mesmo variando na quantidade e distribuição (de centenas a mais de 1000 por célula), sua localização está próxima aos locais onde existe grande consumo de energia. Isto indica uma íntima relação entre essas organelas e as necessidades energéticas da célula, corroborando sua principal função, dentre muitas, de síntese de 90% do ATP celular que é gerado por glicólise e fosforilação oxidativa (Wallace, 1997).

Na glicólise, a glicose é metabolizada a piruvato, com um ganho líquido de duas moléculas de ATP por mole de glicose. O piruvato entra na mitocôndria através do complexo piruvato-desidrogenase, sendo convertido em acetil coenzima A (acetil coA). Isto alimenta o ciclo de Krebs, que serve para doar elétrons, via nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH) aos complexos I e II da cadeia de transporte de elétrons, respectivamente. Os elétrons são transportados para os complexos III e IV da cadeia, através de transportadores especializados, tais como, a ubiquinona c. Os estados redox dos complexos I, II, III e IV são alterados. À medida que os elétrons passam pela cadeia, um gradiente de prótons também é gerado através da membrana mitocondrial interna. O último componente da cadeia, o complexo IV é o único ponto no caminho onde o oxigênio está envolvido. O oxigênio é o aceptor terminal de elétrons e é reduzido a água no processo. Esta força próton produzida pelo movimento do íon do hidrogênio dirige a ATP sintase para gerar ATP de ADP. Aproximadamente 24 a 31 moléculas de ATP são geradas pelo ciclo de Krebs e a cadeia respiratória a partir de uma molécula de glicose, demonstrando assim a eficiência da mitocôndria em relação à glicólise (Wallace, 1997) (Figura 3).

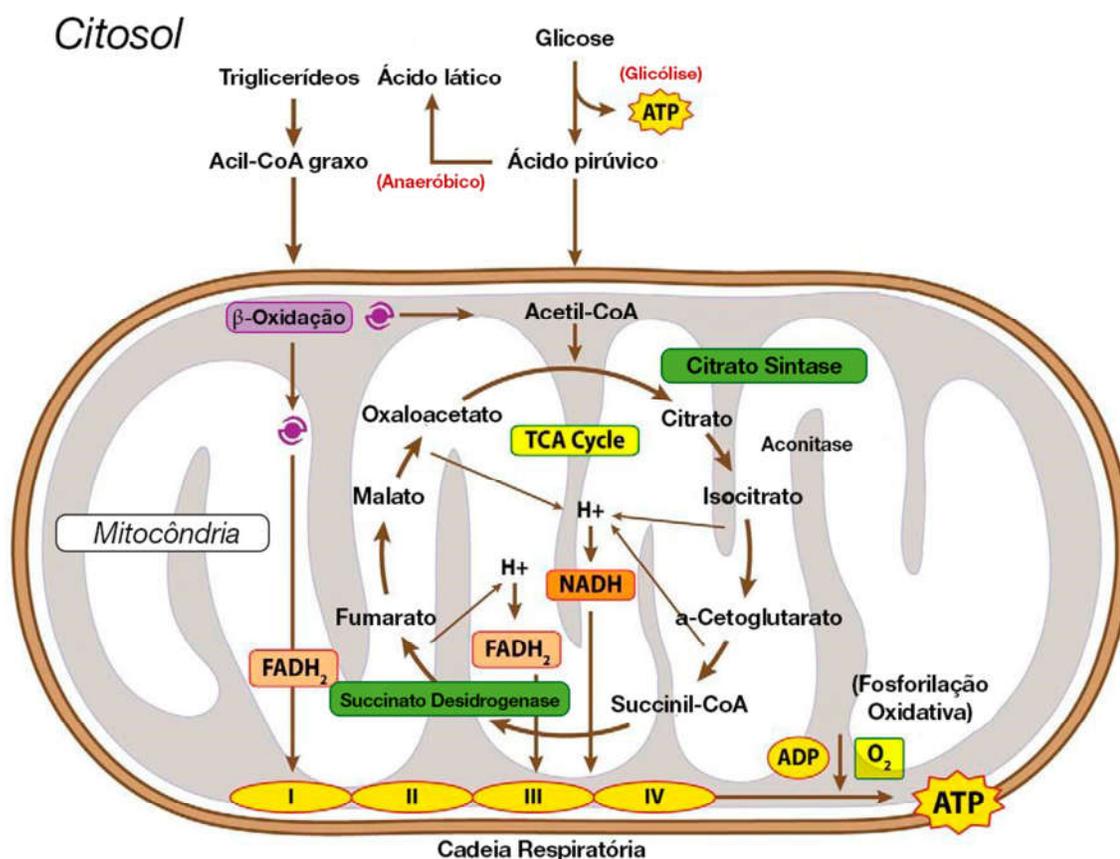


Figura 3: Síntese de ATP. Energia é formada dentro das células através do processamento de substratos vindos da alimentação através do ciclo do TCA e/ou através da β -oxidação de ácidos graxos. A síntese de ATP é dirigida por uma cascata de reações enzimáticas que liberam elétrons de fontes de carboidratos, lipídios e proteínas, os quais são utilizados para a formação de ligações de fosfato que darão origem ao ATP utilizável. A β -oxidação de ácidos graxos envolve uma série de quatro etapas, semelhantes às do ciclo TCA, que são repetidas até que todos os carbonos do canal de ácidos graxos Acil-CoA sejam convertidos para Acetil-CoA. O direcionamento de um substrato energético para a produção de ATP ou síntese de gorduras é dependente do Malonil-CoA. Se o citrato aumenta no citosol, mais malonil-CoA é formado e os ácidos graxos são sintetizados para armazenamento Adaptado de Madamanchi e Runge, 2007.

1.2.1 Genoma mitocondrial

A matriz mitocondrial é também de extrema importância, uma vez que abriga o mtDNA. Desde a década de 60, com a descoberta de que a mitocôndria tem seu próprio DNA, e de 1981, com a publicação de seu sequenciamento completo (Anderson et al., 1981), pode-se acompanhar a descrição de um número crescente de patologias humanas atribuídas a alterações no genoma mitocondrial e seu impacto no comprometimento nas reservas energéticas celulares (Servidei, 2003).

O genoma mitocondrial é particularmente propenso ao estresse oxidativo. O mtDNA é diretamente susceptível ao ataque das ERO produzido durante a fosforilação oxidativa, bem como mutações no mtDNA e consequente disfunção desta organela. (Kubli e Gustafsson, 2012). Enzimas reparadoras fazem-se necessárias para a proteção do DNA nuclear, além disso, o genoma mitocondrial é necessário para manter a integridade funcional das mitocôndrias; enquanto que, apenas um pequeno percentual (7%) do genoma nuclear é expresso em uma dada fase de diferenciação celular (Watson et al., 1997).

Danos ao mtDNA resultante de estresse oxidativo estão associados com a diminuição da capacidade da cadeia respiratória mitocondrial que podem ser potencialmente irreversíveis dependendo da duração e intensidade da exposição ao agente oxidante (Yakes e Van Houten, 1987). Assim, não é surpreendente que o estresse oxidativo e ativação da cascata de reações inflamatórias resultem em depleção no mtDNA em um órgão de importância vital possa contribuir para a incapacitação funcional das mitocondrial durante um quadro séptico (Sulliman et al., 2003). Este dano também pode ativar tanto a autofagia, em uma tentativa de eliminar organelas danificadas e manter a homeostase celular, como morte celular em contextos de elevado dano ou de redução/deficiência de autofagia, e o balanço entre os dois processos determina a sobrevivência celular (Kubli e Gustafsson, 2012).

Células de mamíferos, particularmente do cérebro e da musculatura esquelética, possuem uma demanda energética alta e, portanto, necessitam permanentemente de oxigênio, isto é, do metabolismo mitocondrial eficiente. Ou seja, espera-se que estejam obrigatoriamente com seu metabolismo mitocondrial sem defeitos para constante demanda energética. Nessas células, há em média 10 moléculas de DNA em cada mitocôndria. A formação da cadeia respiratória está sob o controle de dois sistemas genéticos: o genoma nuclear e o mtDNA. Esse mtDNA é responsável pela codificação de 13 polipeptídeos componentes da cadeia respiratória. Mais de 100 mutações no mtDNA são conhecidas em pacientes com encefalopatia mitocondrial associada a acidose láctica (Shon et al., 1997). Alterações da estrutura mitocondrial ocorrem quando há modificação do estado funcional da organela (Zhang, 2013).

As doenças mitocondriais englobam uma variedade de sintomas clínicos que comumente afetam tecidos que requerem muito ATP, não só cerebral e muscular, mas também os dos sistemas renal, endócrino e hepático. Dentre todas essas doenças, as manifestações clínicas neurológicas são as mais frequentes. Como exemplos, o edema

mitocondrial com perda da integridade da membrana externa pode ser um evento iniciador da morte celular necrótica ou apoptótica (Kowaltowski et al., 2001).

Quando há disfunção da cadeia respiratória gera-se, conseqüentemente, a deficiência de ATP, e isto pode estimular a biogênese mitocondrial, processo de geração de mitocôndrias no ciclo celular, através da ativação de genes nucleares de replicação e transcrição mitocondriais na tentativa de compensar defeitos na fosforilação oxidativa. Simonnet e colaboradores (2008), em estudo com células tumorais, concluíram que a deficiência do complexo I pode ser um dos eventos causadores de aumento da biogênese mitocondrial, na tentativa de compensar a fosforilação oxidativa deficiente. Neste foi constatado que o conteúdo e a atividade da NADH desidrogenase e o complexo I estavam diminuídos nestes tumores. Além disso, mitocôndrias danificadas liberam para o ambiente extracelular peptídeos e mtDNA, que podem ativar os neutrófilos e causar ainda mais lesão tecidual (Zhang et al., 2010; Angus e Van der Poll, 2013).

Mesmo com diversos estudos sugerindo que a diminuição do conteúdo do genoma mitocondrial esteja influenciando o prognóstico de patologias neurodegenerativas (Rossignol et al., 2004; Gatenby e Gillies, 2004), ainda pouco se presume sobre o seu real papel na dinâmica mitocondrial. Torna-se cada vez mais evidente a necessidade de mais estudos relacionados a complexidade dos eventos em nível gênico para melhor compreensão da patogenicidade das doenças do SNC. Nesse sentido, o esclarecimento do papel da mitocôndria associado aos seus mecanismos ainda mal compreendidos que acarretam susceptibilidade cerebral à neurodegeneração e à deteriorização cognitiva, revela-se de grande interesse no campo da ES (Sonneville et al., 2013; Widmann e Heneka, 2014).

1.3 ENCEFALOPATIA SÉPTICA E A DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL

A disfunção mitocondrial desempenha importante papel na fisiopatologia da ES (Sharshar et al., 2003; Sonneville et al., 2013; Chaudhry e Duggal, 2014; Dal-Pizzol, 2014). Cerca de 71% dos pacientes sépticos desenvolvem disfunção cerebral aguda (Pine et al., 1983; Sprung et al., 1990; Wilson e Young, 2003), sendo que a ES é um sinal precoce da sepse e está associada ao aumento da taxa de morbidade e mortalidade. A ES resultante de sepse é causada pela inflamação sistêmica na ausência de infecção cerebral direta e caracterizada clinicamente por desaceleração dos processos mentais, atenção prejudicada, delírios, desorientação ou coma (Sprung et al., 1990; Singer, 2011). Além das alterações agudas,

estudos mostram que sobreviventes de sepse apresentam incapacidade cognitiva à longo prazo. Estes sobreviventes não são capazes de retomar as atividades rotineiras (Gordon et al., 2004; Hopkins et al., 2005; Iwashyna et al., 2010; Shah et al., 2013).

Estudos clínicos e experimentais sugerem que um número de fatores contribui para o desenvolvimento da ES, incluindo a geração local de citocinas pró-inflamatórias, microcirculação cerebral comprometida, desequilíbrio de neurotransmissores e falência orgânica periférica (Ritter et al., 2012; Cruz et al., 2012; Macedo et al., 2013). Além disso, uma vez que a inflamação persistir, a excitotoxicidade e o estresse oxidativo pode agravar ainda mais a ES e contribuir para disfunção e degeneração neuronal (Wilson e Young, 2003).

O dano mitocondrial ocasionado por isquemia, estresse oxidativo e demais mecanismos relacionados à sinalização inflamatória, prejudicam o uso do oxigênio celular (Galley, 2011; Angus e Van Der Poll, 2013), não sendo apenas a hipóxia do tecido a única condição essencial à disfunção mitocondrial (Crouser, 2004). Em estudo com modelo animal de inflamação induzida por LPS, foi demonstrado que as mitocôndrias do córtex ficaram mais sensíveis à hipoxemia e que houve diminuição da tensão tissular de oxigênio, o que sugere que esta condição quanto as demais citadas anteriormente estejam envolvidas na patogênese da endotoxemia. No mesmo estudo, foi demonstrado um papel protetor da hipotermia, por redução da demanda metabólica e consequente menor vulnerabilidade das mitocôndrias corticais durante a hipoxemia (Chisholm et al., 2015).

Os mecanismos na fisiopatologia da sepse, geradores de hipóxia tecidual e, portanto, disfunção energética, tendem a desenvolver patologias em tecidos que são fortemente dependentes de uma adequada função mitocondrial, como o cérebro, o qual possui pouca capacidade de regular aumento compensatório de glicólise, apresentando dependência da fosforilação oxidativa (Melov et al., 1999). Mesmo podendo ser considerada reversível, a ES está associada à disfunção cognitiva à longo prazo, ou até mesmo permanente, com consequente acréscimo da mortalidade (Barichello et al., 2005; Sonnevile et al., 2013; Schwalm et al., 2014; Widmann e Heneka, 2014). Apesar da fisiopatologia multifatorial, a ES tem sido descrita como gatilho dos principais mecanismos, como a ativação endotelial com disfunção da barreira hematoencefálica associada à liberação e/ou passagem de ativadores inflamatórios para o parênquima cerebral e ativação microglial, ampliando ainda mais a neuroinflamação (Navarrete et al, 2013; Singer, 2014).

Diferentes mecanismos podem explicar a disfunção mitocondrial e o comprometimento bioenergético celular tais como: disfunções por inibição da cadeia

respiratória, tanto dos complexos I a IV, quanto dos nucleotídeos transportadores; inibição das desidrogenases mitocondriais; queda na concentração de citocromo c oxidase (COX) (Lee e Hüttemann, 2014); desacoplamento respiratório (Crouser, 2004). D'Avilla e colaboradores (2008) demonstraram, em modelo animal de sepse, a redução da eficiência da fosforilação oxidativa no tecido cerebral, através da análise das razões de consumo de oxigênio entre os complexos III e IV da respiração, que se mostraram diminuídas no complexo IV, demonstrando desacoplamento respiratório.

Sabe-se que as diferentes possibilidades supracitadas acima podem culminar em estresse oxidativo e suas consequências, como crise energética, ativação de transcrição de genes inflamatórios (via P13K/MAPK), lesões estruturais e dos próprios componentes da cadeia respiratória (Bozza et al., 2013) e regulação negativa de genes mitocondriais pela inflamação e estresse oxidativo (Crouser, 2004; Singer, 2014). Em defesa contra a elevação de ERO, a mitocôndria possui mecanismos antioxidantes intrínsecos como ex. SOD e glutatona peroxidase (GPx) que, no entanto, pode ficar sobrecarregado em condições patológicas com grande produção de ERO (Singer, 2014). Foi relatado por Guerreiro et al. (2010) a correlação entre atividade aumentada de SOD e pior prognóstico em sepse.

1.4 O PAPEL DA AUTOFAGIA NA DINÂMICA MITOCONDRIAL

A mitocôndria tem sido implicada na participação de diversos eventos relacionados à comunicação celular, com papel integrador, em resposta a vários estressores (Goldenthal e Marin-Garcia, 2004; West, 2011). Apresenta um papel vital na homeostase celular e deve ter seu funcionamento ativamente regulado em resposta a estressores fisiológicos e patológicos por um conjunto abrangente de mecanismos de controle adaptativo de qualidade que otimizam número, distribuição e função mitocondrial, denominados de dinâmica mitocondrial. Esta propriedade de manter equilíbrio funcional, qualidade do mtDNA ocorre através da combinação do resultado de diferentes processos dinâmicos, inter-relacionados, de regulação complexa e variável, de acordo com o ambiente celular, determinado por variados estímulos e tipos de tecido (Kanamaru et al., 2012; Stetler et al., 2012; Cherry e Piantadosi, 2015). Esta dinâmica que visa à homeostase ou adaptação do organismo humano a diferentes condições, abre espaço para a compreensão de seus mecanismos no contexto de inúmeras patologias, como a sepse (Suliman et al., 2010; Kanamaru et al., 2012; Navarrete et al., 2013), doenças hereditárias ou adquiridas, metabólicas, miopatias, neurodegenerativas e várias outras (Westermann, 2010; Burté et al., 2014; Rouault, 2014; Quirós, 2015). Deste modo pode-se aplicar tais conhecimentos em diagnóstico e tratamentos destas patologias.

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, EROS, podem ativar a dinâmica mitocondrial (Nisoli et al., 2003; Nisoli et al., 2008; Hood, 2009; Kowaltowski et al., 2009; Harris et al., 2017).

Trata-se a biogênese mitocondrial como um processo de geração da mitocôndria no ciclo celular, ou como parte de um ciclo normal de renovação, em termos de número, estrutura e função da organela e seus componentes (Hock e Kralli, 2009). Entende-se que ela pode liderar e orquestrar as instruções moleculares pelas quais as células substituem ou

aumentam suas mitocôndrias, proliferando organelas pré-existentes, que ocorre em resposta a maiores demandas energéticas absolutas ou relativas ou perda de reserva funcional devido a danos mitocondriais por eventos patológicos (Suliman e Piantadosi, 2016). Dependendo do estímulo, o programa de biogênese é executado por vias que convergem para famílias de coativadores e fatores de transcrição. Restrição calórica e privação energética, atividade contrátil, frio, estresse oxidativo e inflamatório e diferenciação de células tronco são fatores que interferem na dinâmica mitocondrial ou vias como a biogênese mitocondrial (Ventura-Clapier et al., 2008; Cherry e Piantadosi, 2015).

A biogênese substitui as proteínas danificadas e melhora a capacidade de produção de energia uma vez que, essa energia aumenta ao longo do tempo (Singer, 2014). A regulação da biogênese mitocondrial, que se dá a partir de seus principais fatores de transcrição, como o receptor do coativador alfa 1 gama do peroxissoma (PGC-1 α), fator de transcrição mitocondrial-A (TFAM) e fator respiratório nuclear 1 (NRF-1). A atividade do PGC-1 α é mediada pela interação com os fatores de transcrição NRF 1 e 2 e pela expressão de TFAM. Estes fatores estão envolvidos na regulação coordenada da expressão de genes codificados no DNA nuclear e mitocondrial respectivamente (Short et al., 2003; Scarpulla, 2008).

A dinâmica mitocondrial visa à homeostase ou adaptação do organismo humano a diferentes condições. Dentre seus processos, a fusão e fissão mitocondrial ocorrem a partir de um corpo único ou uma massa organelar, constituído como uma rede mitocondrial (Westermann, 2010; Mishra e Chan, 2014), e que, pelo resultado de seu equilíbrio, determinam a morfologia e distribuição mitocondrial. A fusão parece permitir seleção de genomas funcionais através da troca de conteúdos entre mitocôndrias intactas e disfuncionais, com substituição de mtDNA danificado por mutações, dificultando a perpetuação dos danos e mantendo a homogeneidade mitocondrial. Já a fissão, parece separar as mitocôndrias severamente danificadas de redes mitocondriais saudáveis, sendo conduzidas para um processo específico de autofagia, a mitofagia (Narendra et al., 2008).

Mitofagia é a autofagia específica para eliminação de mitocôndrias e um processo altamente regulado que requer a função coordenada de proteínas mitocondriais e citosólicas (Narendra et al., 2008; Youle e Narendra, 2011). Duas proteínas *PTEN-induced putative protein kinase 1* (PINK1) e *E3 ubiquitin ligase Parkin* (Parkin) desempenham importantes papéis no controle de qualidade mitofágica. Nas mitocôndrias íntegras, PINK1 é importado para mitocôndrias e, em seguida, sofre clivagem e degradação na membrana mitocondrial interna (Greene et al., 2012 e Thomas et al., 2014). No entanto, quando as mitocôndrias são

danificadas e o potencial de membrana mitocondrial é dissipado, PINK1 é estabilizado na membrana mitocondrial exterior, onde recruta Parkin para mitocôndrias danificadas (Misesuda et al., 2010, Narendra et al. Vives-Bauza et al., 2010; Eiyama e Okamoto, 2015). A regulação destes processos de fusão e fissão mitocondriais, se faz principalmente por membros da família de ATG (Lu et al. 2013). Processos de fosforilação associados a estas e diversas outras proteínas específicas interferem na dinâmica mitocondrial, sendo importante para manter a qualidade mitocondrial (Twig e Shirihai, 2011; Kanamaru et al., 2012; Okamoto e Kondo-Okamoto, 2012).

Evidências recentes implicam que autofagia desempenha um papel crucial em numerosas doenças neurodegenerativas. A interferência entre inflamação e autofagia tem atraído atenção nos últimos anos (Chu e Zhu, 2007; Wong et al, 2010; Wu et al., 2016; Harris, 2017; Hill et al., 2019; Jang et al., 2019). A autofagia manifesta-se com a vacuolização citoplasmática extensa e culminando de forma semelhante com a absorção fagocítica e consequente degradação lisossômica. Processo dinâmico, envolve o fluxo completo desde a formação de autofagosomas até a fusão com lisosoma ("fluxo de autofagia") (Su et al., 2015).

A autofagia também pode ser compreendida como um mecanismo hemostático evolucionariamente conservado que ocorre continuamente, em níveis basais, nas células normais, sendo responsável por degradar organelas celulares e proteínas, mantendo a biossíntese celular durante a privação de nutrientes, estresse metabólico ou processos autodefensivos (Yang et al; Ozpolat e Benbrook, 2015; Harris et al 2017).

Uma característica morfológica marcante de células em processo autofágico é a presença de vesículas, semelhantes a vacúolos, em seu citoplasma (Galluzzi et al., 2012). Essa vacuolização é resultante da formação de autofagossomos que encapsulam organelas defeituosas ou restos celulares e depois se fundem com os lisossomos. A formação dos autofagossomos e a regulação da autofagia são processos complexos que incluem distintas fases (indução, nucleação, alongamento e fusão) e envolver a participação de diversas proteínas nesse processo (Gozuacik et al., 2017). O mecanismo alvo da rapamicina do complexo 1 (mTORC1), por exemplo, ao ser inativado em condições de falta de nutrientes, dá início à fase de indução da autofagia. Na nucleação, iniciada pelo complexo fosfatidil inositol 3cinase (PI3K), participam, dentre outras proteínas: Beclina-1 como promotora e proteínas da família Bcl-2 como reguladores. Já na fase do alongamento, a proteína de cadeia leve associada a microtúbulos 3 (LC3) exerce papel fundamental na expansão das membranas autofágicas e no seu fechamento (Figura 4) (Gozuacik et al., 2017). As estruturas alvo são isoladas por vesículas de um conjunto de proteínas da família ATG as quais são codificadas

pelos genes Atg (Yang e Klionsky, 2010). Dentre seus principais papéis, incluem-se a manutenção da homeostase celular e a resistência a agentes patogênicos, a fim de garantir o ciclo de vida intracelular (Mizushima et al., 2011).

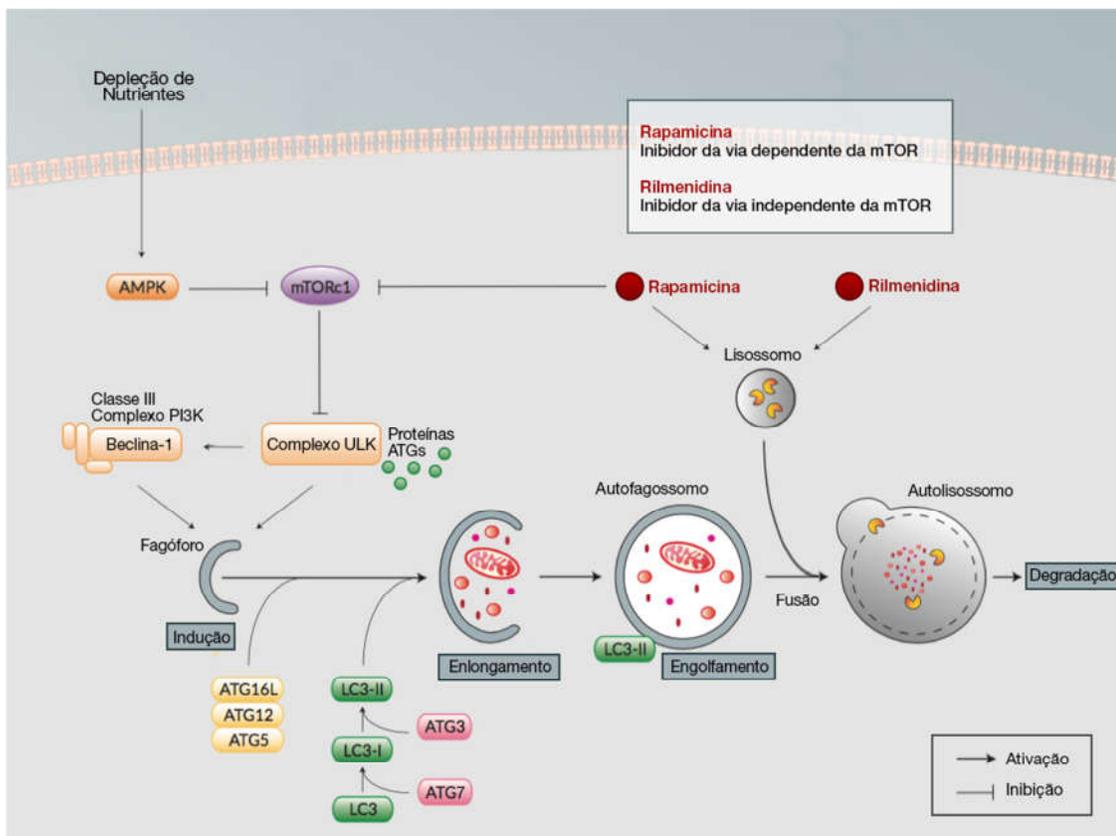


Figura 4: Representação esquemática das etapas de formação dos autofagossomos e de proteínas e vias relacionadas com o processo autofágico. Depleção de nutrientes ativam autofagia através das vias de sinalizações mTOR e AMPK, que regulam a biogênese dos autofagossomos. A macrofagia é ativada via mTOR independente. O sistema de conjugação promove a formação da proteína LC3-II na membrana autofagossomal (fagóforo) e após o englobamento dos componentes celulares, forma-se o autofagossomo. A fusão entre autofagossomos e lisossomos formam os autofagolisossomos. Os componentes celulares são degradados nos autofagolisossomos por enzimas hidrolíticas presentes nos lisossomos, e ocorrendo a degradação desses componentes dentro do citoplasma estimulação inibição. Rapamicina – inibidor da via mTOR; Rilmenidina – inibidor independente da via mTOR. Fonte: Elaborado pela autora.

A indução de autofagia requer, portanto, a dissociação de Beclina-1 dos seus inibidores. Para que ocorra o alongamento da membrana, dois sistemas de conjugação são ativados: o primeiro é formado pelas proteínas ATG5-ATG12-ATG16L, o qual se dissocia completamente da membrana quando o autofagossomo está maduro. O segundo complexo envolve a conjugação da fosfatidiletanolamina (PE) com LC3I pela ação sequencial de ATG4, ATG7 e ATG3. Essa conjugação de LC3I com PE leva a conversão da proteína à sua forma lipidizada (LC3II), a qual associa-se à membrana do autofagossomo permanecendo até que a estrutura seja finalizada (Mizushima et al., 2011).

Esse processo de autofagia 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; Feng, 2014). Além disso, o *pool* dessas proteínas encontradas no interior do autofagossomas desempenha um papel fundamental no reconhecimento e seleção de cargas específicas degradadas pela autofagia. Entretanto, ela também é uma estratégia utilizada pelas células 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 está completamente esclarecido (Codogno e Meijer, 2005; Erlich et al., 2006).

1.5 MODULAÇÃO DA AUTOFAGIA MITOCONDRIAL

Visto que a homeostase e a qualidade mitocondrial são reguladas por um complexo processo dinâmico mitocondrial, incluindo auto/mitofagia e biogênese mitocondrial (Palikaras et al., 2015), entre os quais destaca-se os reguladores da autofagia mTOR e AMPK, as quais atuam sobre as taxas de formação de vesículas autofágicas (Kepp et al., 2011; Ozpolat e Benbrook, 2015; Qian et al., 2017)

O mTOR é o principal regulador da ativação/supressão da autofagia em condições fisiológicas e/ou de estresse celular, podendo formar dois complexos distintos: complexo 1 da mTOR (mTORC1) e complexo 2 da mTOR (mTORC2), sendo que mTORC1 tem como principal função a regulação da autofagia (Jung et al., 2010). A depleção ou disponibilidade reduzida de nutrientes e/ou de fatores de crescimento levam à inibição de mTORC1, que tem sido considerada como passo crucial para a indução de autofagia em células eucarióticas nessas condições (Alers et al., 2012). Essa inibição também pode ser induzida por rapamicina (Ravikumar et al., 2010). A AMPK, por sua vez, sensível ao estado de energia na célula, é ativada pelo aumento da razão AMP/ATP, levando à inibição de mTORC1, induzindo autofagia (Kim et al., 2011). A ativação da autofagia tem sido utilizada como potencial alvo terapêutico para o tratamento do câncer (Keep et al., 2011; Kimmelman, 2011; Yang et al., 2011; Kubisch et al., 2013; Ozpolat e Benbrook., 2015).

A proteína LC3 existe na forma citosólica (LC3-I) e na forma lipídica conjugada com fosfatidiletanolamina (LC3-II) (Figura 4) acoplada nas faces interna e externa da

membrana do autofagossomo em formação, sendo essencial nesse processo (Chifenti et al., 2013). É importante destacar que, logo após a fusão de um autofagossomo com o lisossomo, ocorre a degradação da LC3-II pelas hidrolases presentes na vesícula formada, que a partir desse ponto é denominada autolisossomo. Este fato associado à ancoragem específica de LC3II na membrana do autofagossomo qualificam essa proteína como um marcador em potencial para monitorar autofagia, sendo marcador da finalização do processo de formação dos autofagossomos (Nakatogawa et al., 2009; Mizushima et al., 2011).

A Beclina-1 é uma proteína multifuncional que exerce papel fundamental na diferenciação celular, na apoptose e principalmente na autofagia, além de numerosos processos biológicos como adaptação ao estresse, endocitose, imunidade, tumorigênese, envelhecimento e morte celular (Lee et al., 2007; Levine e Sinha e Kroemer., 2008; WIrawan et al., 2012). Diferentemente da LC3, a Beclina-1 participa dos estágios mais precoces da formação dos autofagossomos, recrutando proteínas citosólicas e promovendo o processo de nucleação das vesículas autofágicas (Harris et al 2017).

Além da regulação por vias mTOR- dependentes, há também regulação por mTOR-independentes, através da rilmenidina, que é um análogo da rapamicina (Narendra et al., 2010, Feng et al., 2013; Winklhofer, 2014, Frake et al., 2015).

A rilmenidina é utilizada na clínica como agente anti- hipertensivo de ação central. Seus efeitos quanto a esta terapêutica são obtidos graças à sua interação com o receptor I₁, levando a uma redução sistêmica do tônus simpático e à redução da resistência vascular periférica (Reid, 2000). Seu mecanismo de ação apresenta maior seletividade para receptores imidazólicos (Bricca et al., 1989). Estudos já demonstraram seu efeito antinociceptivo em modelos experimentais de dor neuropática(Kim., 2009) e somática (Sabetkasaie et al., 2007) em ratos e sua ação sedativa é dose dependente e resultante da ação sobre receptores alfa 2-adrenérgicos no locus coeruleus(Li e Dampney., 1995).

Atualmente, a rilmenidina encontra-se disponível no mercado apenas na forma de comprimidos para administração oral. Já a clonidina encontra-se disponível no mercado brasileiro em apresentações tanto para administração injetável quanto para administração oral. Sabe-se que a clonidina, quando administrada por via oral em humanos, é capaz de induzir sedação e outros efeitos, tais como hipotensão, analgesia e uma ação anti-sialagoga(11). Outros autores já adotaram a via oral para administração experimental de fármacos em equinos(12-16). É o caso, por exemplo, de Olson et al.(12), que avaliaram os efeitos analgésico e anti-inflamatório da suspensão oral de meloxicam, e Caldwell et al.(13), que estudaram a eficácia terapêutica da gabapentina em cápsulas em equinos com claudicação

Um aparente benefício adicional da auto-regulação da autofagia nos modelos de doenças neurodegenerativas é a proteção das células contra danos apoptóticos (Ravikumar et al., 2006). Algumas evidências também indicam que a autofagia pode proteger as células contra a morte celular necrótica (Wu et al., 2008). Corroborando esses dados, foi observado por Wu et al (2015), que a expressão de beclina-1, mTOR e LC3 em amostras de pacientes com câncer colorretal estava significativamente aumentada em relação aos tecidos adjacentes, tanto a nível de mRNA quanto a nível proteico. Nesse mesmo estudo, a expressão aumentada de LC3 foi relacionada a melhor prognóstico, levando à hipótese de que LC3 age como supressor tumoral; ao contrário de mTOR que foi associado a um perfil prognóstico desfavorável, aparentemente contribuindo com a progressão tumoral (Wu et al., 2015). As abordagens terapêuticas que promovem a autofagia poderiam, portanto, ter dois efeitos benéficos no contexto de doenças neurodegenerativas: em primeiro lugar, podem melhorar a remoção de proteínas tóxicas agregadas aos neurônios e, segundo, proteger os neurônios da apoptose (Ravikumar et al., 2004; Ravikumar et al., 2006). Estudos demonstraram que a rapamicina aliviou a supressão da autofagia durante a sepse, resultando em uma inibição da inflamação mediada por LPS e redução da apoptose (Yen et al., 2013; McKee-Muir e Russell, 2017). Coletivamente, os dados dos estudos supracitados reforçam a hipótese de que a regulação da via da autofagia exerce um papel fundamental na função mitocondrial, bem como ressaltam que a diminuição da atividade autofágica parece ser uma característica marcante e essencial no desenvolvimento de patologias do neurodesenvolvimento (Wu et al., 2016)

Compreendendo o papel da regulação da função mitocondrial frente a diversos insultos estressores, como a sepse, e no contexto da encefalopatia, com marcante morbidade dos sobreviventes, propõe-se buscar e compreender possíveis mecanismos de preservação e/ou recuperação da função mitocondrial por estimulação da dinâmica mitocondrial, tendo um foco na neuroproteção e redução dos danos cognitivos de longo prazo. Os mecanismos de controle da via relacionados à autofagia mitocondrial, dentro de um conceito de dinâmica mitocondrial e controle da função desta organela, permitem investigações sobre prováveis benefícios de intervenções terapêuticas que venham minimizar as consequências desta patologia inflamatória. Como esses processos são modulados durante o desenvolvimento da sepse, o impacto sobre a função cerebral de estimular a dinâmica mitocondrial ainda permanece desconhecido.

O presente estudo tem como hipótese que a disfunção mitocondrial ocorre tardiamente após o desenvolvimento da sepse devido à disfunção da dinâmica mitocondrial, e isso poderia contribuir para o comprometimento de longo prazo.

2 JUSTIFICATIVA

Este cenário evidencia a necessidade de esforços continuados em busca do desenvolvimento de novos fármacos ou tratamentos para o controle e prevenção da sepse, considerando que os sobreviventes sépticos (pacientes e modelos animais) apresentam déficit cognitivo e alterações bioquímicas e moleculares. Especula-se que os parâmetros inflamatórios e de metabolismo energético, em particular a autofagia mitocondrial, estejam envolvidos na fisiopatologia da sepse, sobretudo do dano cognitivo. Sendo assim, este estudo investigou tais parâmetros nas fases iniciais e tardias da sepse, com o objetivo de contribuir na elucidação dos mecanismos bioquímicos responsáveis pelas alterações cognitivas presentes nesta condição clínica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o papel da dinâmica mitocondrial na disfunção cognitiva tardia sobre parâmetros bioquímicos, imunoquímicos, moleculares e comportamentais observados em ratos sobreviventes a um modelo experimental de sepse.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a concentração de ATP e consumo de oxigênio nos tempos de 24 horas, 3 e 10 dias, no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a sepse;

- Quantificar as proteínas da via da autofagia (ATGs, Beclina e LC3) e mitofagia (PINK e Parkin) nos tempos de 24 horas, 3 e 10 dias, no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a sepse;

- Quantificar o conteúdo proteínas mitocondriais Mn-SOD e COX nos tempos de 24 horas, 3 e 10 dias, no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a sepse;

- Mensurar o efeito da rapamicina e rilmenidina na concentração de ATP no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a sepse após 10 dias.

- Mensurar os efeitos da rapamicina e rilmenidina no consumo de oxigênio no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a sepse após 10 dias.

- Avaliar os efeitos da rapamicina e rilmenidina na carbonilação de proteínas no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a sepse após 10 dias.

- Mensurar os efeitos da rapamicina e rilmenidina nas atividades dos complexos da cadeia respiratória e enzimas citrato sintase e succinato desidrogenase no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a sepse após 10 dias;

- Avaliar os efeitos da rapamicina e rilmenidina na disfunção cognitiva observada em esQUIVA inibitória e reconhecimento de objetos de animais submetidos a sepse após 10 dias;

- Avaliar os efeitos da rapamicina e rilmenidina na concentração da razão mtDNA/gDNA no córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos a sepse após 10 dias;

- Analisar a ultraestrutura das mitocôndrias por microscopia eletrônica no córtex pré-frontal e hipocampo após tratamento com e sem rapamicina e rilmenidina de animais submetidos a sepse após 10 dias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados neste estudo ratos *Wistar* machos, com pesos aproximados de 250 a 300 g, com 60 dias de vida, provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), onde permaneceram alojados em local fresco e arejado em um ciclo 12 horas claro/escuro (6h às 18h) a uma temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com alimento e água sempre disponíveis.

A utilização dos animais seguiu protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade e seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 85-23, revisada em 1996). O número de animais em cada grupo foi baseado em estudos prévios, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados, com uma variância de no máximo 10% entre as médias. Os procedimentos foram aceitos pelo Comissão de Ética no Uso Animal, UNESC, Brasil, pelos protocolos nº 012/2016-2; 060/2017-1.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Laboratório de Neurociências e no Biotério da UNESC, em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.2 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE

O modelo de sepse utilizado neste estudo foi de sepse abdominal por peritonite fecal, denominado CLP (em inglês, *Cecal ligation and puncture*) (Figura 5), conforme previamente descrito (Ritter et al., 2003). Brevemente, os ratos foram anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg), evitando qualquer quadro algico durante a realização do procedimento cirúrgico. Este consiste de laparotomia mediana, mobilização externa do ceco com ligadura do mesmo logo distal à válvula íleo cecal, com fio de

mononylon 3-0, mantendo, desta forma, a continuidade intestinal. O ceco foi então perfurado com uma agulha número 14-gauge em região contra-mesentérica e suavemente comprimido, para gerar extrusão de conteúdo fecal e, em seguida, reposicionado na cavidade peritoneal. Por fim, a incisão foi suturada, com fio mononylon 3-0. Os ratos foram observados pelo período de duas horas para recuperação. Foi realizado, também, um grupo controle, denominado sham, onde os ratos foram submetidos à laparotomia, com manipulação (exteriorização e reposicionamento intraperitoneal) do ceco, mas sem ligadura ou perfuração.

De imediato, após a cirurgia, todos os ratos foram tratados com ressuscitação volêmica, utilizando-se salina (50 mL/kg) e antibioticoterapia com ceftriaxona (30mg/kg a cada 12 horas por 3 dias) (Fink et al., 1990).

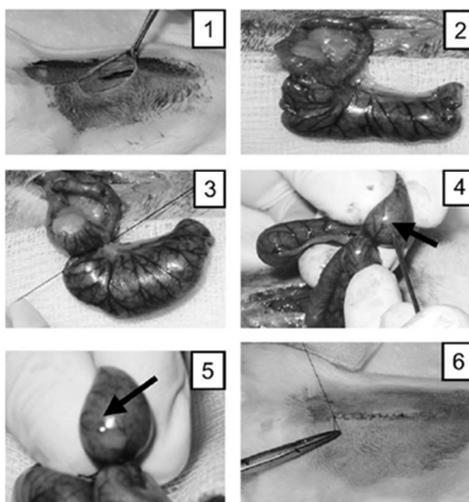


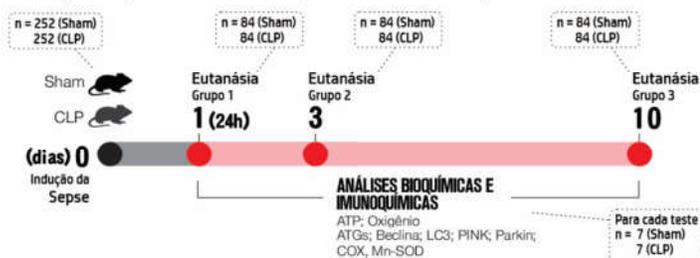
Figura 5: Modelo experimental de sepse abdominal por peritonite fecal (CLP): 1. Laparotomia mediana; 2. Exposição o intestino; 3. Punção no ceco; 4. Perfuração do ceco; 5. Pressinar o ceco; 6. Sutura. Fonte: Fink et al., 1990.

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Este estudo foi dividido em dois protocolos experimentais. No Protocolo I, duas etapas foram realizadas a fim de comprovar a hipótese de que o comprometimento cognitivo a longo prazo após sepse tardia está relacionado à disfunção mitocondrial. O Protocolo II, foi realizado após os resultados do protocolo I, com o tratamento com os fármacos rapamicina e rilmenidina, a fim de regular a dinâmica mitocondrial e diminuir o comprometimento cognitivo após sepse tardia (10 dias) (Figura 6).

PROTOCOLO I

Avaliação dos parâmetros da disfunção mitocondrial na sepse



PROTOCOLO II

Avaliação da dinâmica mitocondrial após sepse tardia

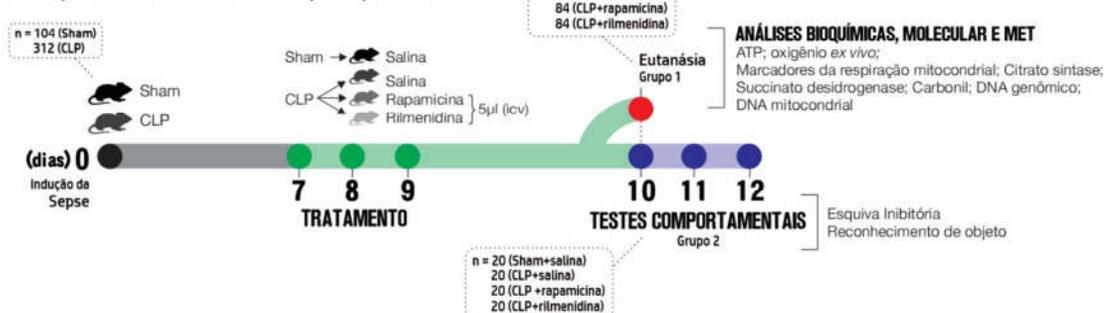


Figura 6: Desenho Experimental Fonte: Da autora.

4.3.1 Protocolo I

Na primeira etapa deste experimento, os animais foram mortos 24 horas, 3 e 10 dias após indução e as estruturas cerebrais do hipocampo e córtex pré-frontal foram removidas e armazenadas em *freezer* a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as análises bioquímicas, imunológicas e moleculares até o momento das suas realizações. Com exceção para a técnica oximetria tecidual (consumo oxigênio *ex vivo*) que foi realizada imediatamente após a retirada das estruturas cerebrais à fresco.

Os parâmetros avaliados foram: a concentração de ATP e consumo de oxigênio *ex vivo*. Posteriormente, em uma segunda etapa, foram quantificadas as proteínas das vias da autofagia e mitofagia e, as proteínas envolvidas na pré-formação e formação da estrutura fagossômica. Para cada tempo, foram padronizados dois grupos experimentais: sham e CLP.

Para cada grupo o n foi de sete animais. Para a realização do protocolo I, foram utilizados um total 504 animais.

4.3.2 Protocolo II

Para este segundo protocolo, foi iniciado o tratamento dos animais sépticos e comparados com o controle sham, para avaliar a dinâmica mitocondrial através dos ativadores da via da autofagia na sepse tardia. No 7^o, 8^o e 9^o dias consecutivos após indução da sepse, os animais foram tratados via icv com os fármacos dependentes e independentes da via mTOR – rapamicina (10mg/Kg) e rilmenidina (5mg/kg) nos quais, sob anestesia leve com 5% de isoflurano (1L/min de O₂ e 1L/min O₂ ambiente), e assim mantidos, utilizando o fluxo de 1-2% de isoflurano. As doses obedeceram ao protocolo previamente descrito na literatura (Morgenweck et al., 2010), considerando-se administração única diária de 5µl via intracerebroventricular (icv) diluídos em solução fisiológica.

Com o início do tratamento, os animais foram subdivididos em seis grupos experimentais: sham + salina; sham + rapamicina; sham + rilmenidina; CLP + salina; CLP + rapamicina; CLP + rilmenidina). Ao completar os 10 dias, 24 horas após a última administração dos fármacos, os animais foram submetidos aos treinos/testes comportamentais de reconhecimento de objetos e esquivas inibitórias com um número de dez animais para cada teste. Estes testes, foram realizados no 10^o, 11^o e no 12^o dia após a indução da sepse ou grupo sham. Os demais animais foram mortos e as estruturas cerebrais do córtex pré-frontal e hipocampo foram retiradas para avaliar se os fármacos ativadores da autofagia mitocondrial poderiam melhorar a função mitocondrial após sepse tardia.

Para esta etapa, foram mensurados, novamente no córtex pré-frontal e hipocampo a concentração de ATP e consumo de oxigênio à fresco, como também, as atividades dos complexos I, II, II-III e IV da respiração mitocondrial e a atividades das enzimas citrato sintase e succinato desidrogenase do ciclo de Krebs e a carbonilação de proteínas.

Em uma última etapa, outro grupo de animais foram submetidos a indução de sepse e congelados a -80C até o momento dos procedimentos e, novamente, tratados com os mesmos fármacos, porém, novas análises foram realizadas. Foram elas, a quantificação da relação mtDNA/gDNA. Por fim, realizado a análise da ultraestrutura das mitocôndrias em microscópio eletrônico. Para essa etapa, os animais foram subdivididos em quatro grupos:

sham + salina; CLP + salina; CLP + rapamicina; CLP + rilmenidina) com sete animais em cada. Para este protocolo II foram utilizados 416 animais.

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os animais foram submetidos a testes comportamentais de aprendizado e a memória, onde foram avaliados em tarefa específica de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos (memória de habituação) 10 dias após indução de sepse. O procedimento de teste comportamental foi conduzido entre 13:00 e 16:00 horas em sala isolada de som, utilizando animais diferentes para cada teste comportamental. Todos os testes foram realizados por pessoas que desconheciam o experimento e/ou grupo experimental.

4.4.1 Esquiva inibitória

O equipamento para realização desse teste consiste em uma caixa de acrílico na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento é colocada junto à parede esquerda do aparelho (Roesler et al., 1999). A sessão de treino, foi realizada 10 dias após a indução de sepse. Os animais foram colocados sobre a plataforma e foi cronometrado o tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma (tempo de latência). Imediatamente após descer da plataforma (com as 4 patas), o animal recebeu um choque de 0,4 mA durante 2 segundos. Na sessão teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele levou para descer, porém não foi administrado choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória. Os intervalos entre o treino e o teste foram de 1,5 horas para medir memória de curta duração (Quevedo et al., 1997) e 24 horas para memória de longa duração (Figura 7) (Izquierdo et al., 1998).



Figura 7: Teste da esquiva inibitória. No primeiro dia, é realizada a sessão de treino. O animal é colocado sobre a plataforma, avaliando-se o tempo em que ele toma para descer da plataforma com as quatro patas. Ao descer, o animal recebe um choque. A sessão de teste consiste em colocar o animal novamente na plataforma, medindo-se o tempo que o mesmo leva para descer, sem administrar choque após a descida. O teste é realizado em dois momentos: 1h30min após o treino, a fim de avaliar a memória de curta duração, e 24 horas após o treino, para a avaliação da memória de longa duração. Fonte: Da autora.

4.4.2 Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado em campo aberto. Esse teste é muito usado para avaliar a capacidade de memorizar e reconhecer objetos novos e já conhecidos. No primeiro dia, antes de qualquer procedimento, considerado o dia da habituação, cada rato foi colocado individualmente no canto superior esquerdo da caixa, e deixado por 5 minutos, sem nenhum objeto na caixa, para que se habitue-se ao ambiente. Após 24 horas, na sessão treino, o animal foi recolocado no campo aberto, com dois objetos exatamente iguais A1 e A2 de brinquedo de Lego duplo, exatamente no meio da caixa, paralelos e deixados por 5 minutos para que os animais explorem o ambiente livremente. O tempo de exploração de cada objeto foi cronometrado e posterior analisado através do índice de reconhecimento. No mesmo dia em 1h e 30min após a sessão teste, para a avaliação da memória de curta duração, o animal foi recolocado na caixa com dois objetos (A1 e B1) que eram semelhantes na cor e tamanho, porém de formas diferentes. Nessa sessão, os animais foram deixados durante 5 minutos para explorar os objetos. Para testar a memória de longa

duração, o animal foi recolocado na caixa 24 horas após a sessão treino, com dois objetos, um que ele já está familiarizado, o objeto A1, e outro objeto totalmente distinto de todos os outros, o objeto C1, de cor, forma e tamanhos diferentes. Nessa sessão, os animais tiveram, também, 5 minutos para explorar o novo objeto (Figura 8) (Rossato et al., 2007).

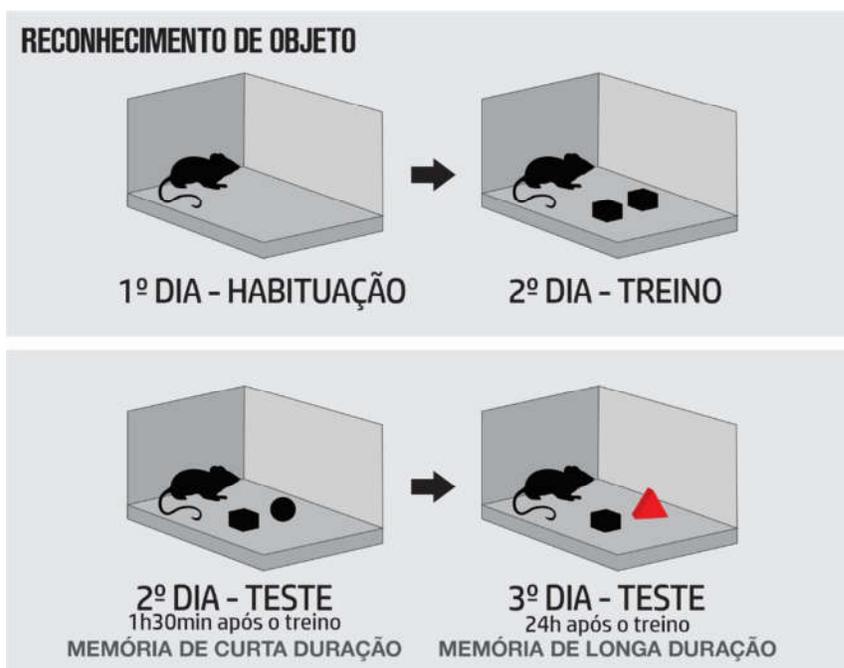


Figura 8: Teste de reconhecimento de objetos. No primeiro o dia, o animal é colocado na caixa em que será realizado o teste, sem objetos, com a finalidade de habituação do local. A sessão de treino é realizada no segundo dia, dois objetos iguais são colocados na caixa onde está o animal, deixando-o explorar o local durante 5 minutos. A sessão de teste é realizada em dois momentos: 1h30min após o treino, onde são colocados dois objetos de formatos diferentes e cores iguais, para a avaliação da memória de curta duração. E 24h após o treino, onde são colocados dois objetos de formatos e cores diferentes, para a avaliação de longa duração. Fonte: Da autora

4.5 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL FRENTE AO INSULTO SÉPTICO E PÓS ESTIMULAÇÃO DE AUTOFAGIA

4.5.1 Consumo *ex vivo* de oxigênio

A taxa de consumo de oxigênio foi medida por respirometria de alta resolução (*2k-Oxygraph*; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) utilizando glutamato/malato (2,5 mM cada), α -cetogluturato (5,0 mM), succinato (5,0 mM) como substratos respiratórios. Os homogeneizados do hipocampo e córtex pré-frontal foram incubados em tampão contendo

KCl a 130 mM, KH₂PO₄ 10 mM, 200 uM de EGTA, 10 mM de HEPES (pH 7,4). Após a depleção de substratos endógenos, o estado 3 da respiração mitocondrial foi iniciado com a adição de 1 mM de ADP. A amostra permanece no meio até o esgotamento completo de oxigênio. Os resultados foram padronizados como a quantidade de proteína e expressos em nmoles de O₂ / min / mg de proteína, de acordo com Rosenthal et al (1987).

4.5.2 Níveis de ATP

A avaliação dos níveis celulares de ATP foi realizada conforme previamente descrito (Van Laar et al., 2011). As amostras (hipocampo e córtex pré-frontal) foram homogeneizadas em tampão PBS, mantido a baixas temperaturas e centrifugadas a 2000g por 5 minutos. O *pellet* foi obtido e resuspendido em tampão de lise. Os níveis de ATP intracelular foram determinados usando um kit de determinação de ATP, baseado na reação da luciferase com luciferina e medido usando um luminômetro em microplaca. Este kit inativa irreversivelmente as enzimas que degradam o ATP (ATPases) durante a etapa de lise, assegurando que o sinal luminescente obtido corresponda aos níveis endógenos de ATP (Abcam). Os dados foram normalizados pela concentração de proteína.

4.5.3 Expressão do conteúdo de proteína mitocondrial e dos ativadores da autofagia/mitofagia por *Western Blotting*

A expressão proteica do conteúdo de proteína mitocondrial COX e Mn-SOD, PINK1, Parkin, Beclina-1, LC3 A/B e os ATGs (ATG 5, ATG12, ATG16L1, ATG7 e ATG3), no hipocampo e córtex pré-frontal foram mensuradas usando análise por *Western blotting*.

Para realizar a imunotransferência do conteúdo de proteína mitocondrial e marcadores de amostras autofagia e mitofagia, tecido cerebral foram homogeneizadas e, em quantidades iguais de proteína (30 ug / poço), foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose.

As membranas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-COX (1: 1000) (ABCAM - Brasil), anti- SOD2 (1:1000) (ABCAM - Brasil), anti-parkin (SLBK5279V, SIGMA - Brasil) mAb de Coelho (1:1000); Anti-PINK1 (078K4802, SIGMA - Brasil) mAb

de Coelho (1: 1000) e utilizando um kit de autofagia (Cell Signalling) que contém: Beclin-1 (D40C5) Rabb mAb (1:1000); MAb de coelho LC3A / B (D3U4C) (1:1000); Atg5 (D5F5U) mAb de Coelho (1:1000); Atg12 (D88H11) mAb de Coelho (1:1000); Atg16L1 (D6D5) mAb de Coelho (1:1000); Atg7 (D12B11) mAb de Coelho (1: 1000); Atb3 Anticorpo Coelho mAb (1:1000). A IgG anti-coelho secundário foi encubada com a membrana durante 2 horas (1:10000). A imuno-reatividade foi detectada por quimioluminescência usando substratos quimioluminescentes (ECL) (Bio-Rad - Brasil) para a detecção da atividade da enzima peroxidase de horseradish (HRP). A análise de densitometria foi realizada com o *software Image J®* v.1.34. Todos os resultados foram expressos como uma relação relativa entre o alvo e a p-actina.

4.5.4 Dano oxidativo

O dano oxidativo foi realizado pela determinação de grupamentos carbonil no conteúdo das estruturas do córtex pré-frontal e hipocampo, conforme previamente descrito por Levine e colaboradores (1990). As amostras obtidas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético e 20% e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina (DNPH). Os grupos carbonila foram quantificados no espectrofotômetro na absorvância de 370 nm e a unidade de medida foi nmol/mg proteínas.

4.5.5 Proteínas

A quantidade total de proteínas de cada técnica foram mensuradas utilizando o ensaio de proteína de Lowry e colaboradores (1951) e a albumina bovina sérica (BSA) foi utilizada como padrão de proteínas. O reagente de Folin foi adicionado às amostras de tecido, onde sua principal função é ligar-se a proteínas e posteriormente reduzido. A alteração de cor resultante a partir de amarelo para azul pode ser observado através da medição da absorvância a 700nm.

4.5.6 Atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial

Atividade de complexo I: A atividade da NADH-desidrogenase foi avaliada pelo método descrito por (Cassina; Radi, 1986), a taxa de redução de ferricianeto dependente de NADH a 420 nm.

Atividade do Complexo II: As atividades da enzima foram medidas pelo método descrito por (Fischer et al., 1985) onde a diminuição da absorvância do 2,6-DCIP a 600 nm foi utilizada para calcular a atividade do complexo II.

Atividade do complexo II-III: a citocromo c oxidoreductase será determinada de acordo com (Fischer et al., 1985) que foi medida pela redução do citocromo c no succinato a 550 nm.

Atividade complexa IV: A preparação da amostra era a mesma que para a citrato sintase. A atividade do complexo IV foi determinada de acordo com (Rusti et al., 1994) e calculada pela diminuição da absorvância causada pela oxidação reduzida do citocromo c, medida a 550 nm.

A atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foi expressa como nmol / min / mg de proteína.

4.5.7 Atividade das enzimas do Ciclo de Krebs

A atividade da enzima citrato sintase foi realizada através da reação de conversão de oxaloacetato e acetil-CoA a citrato e SH-CoA, catalisada pela citrato sintase foi acompanhada medindo-se espectrofotometricamente o produto de reação, ácido tionitrobenzóico (TNB) (Shepherd e Garland, 1969). As diferentes suspensões foram incubadas a 37°C em meio de reação tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo triton X-100 0,1%, oxaloacetato 250 µM, acetil-CoA 50 µM, e ácido ditionitrobenzóico (DTNB) 100 µM. O intenso aumento na absorbância a 412 nm foi registrado durante 8 minutos. A atividade de enzima succinato desidrogenase foi determinada de acordo com o método de Fischer et al. (1985). Baseia-se na diminuição da absorvância de 2,6-di-cloro-indofenol (2,6-DCIP) a 600 nm.

4.5.8 Análise molecular da razão de DNA mitocondrial total/DNA genômico por *Turbized*

A análise molecular do mtDNA foi realizado utilizando o kit da (Abcam, ab65321), seguindo as instruções do fabricante. O DNAm_t foi isolado através das fatias de córtex pré-frontal e hipocampo com elevado rendimento e pureza, sem contaminação a partir do DNA genômico. A apresentação do gráfico foi realizada utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism versão 5.0;

Já o isolamento do gDNA, foi realizado pelo mini *kit PureLink™*, que permite uma purificação rápida e eficiente do DNA genômico (gDNA). O *kit* foi projetado para isolar eficazmente o gDNA com tecidos de mamíferos, cauda de rato, rato, amostras de sangue e bactérias. Após a preparação do lisado, o gDNA foi rapidamente purificado utilizando um processo de centrifugação baseado em coluna de spin. O DNA isolado tem um tamanho de 20-50 kb. Foi realizada a quantificação dos isolados de mtDNA e gDNA utilizando o espectrofotômetro na absorvância UV a 260 nm. Os dados foram expressos na razão de mtDNA/gDNA.

4.5.9 Análise ultra estrutural das mitocôndrias por microscopia eletrônica de transmissão

Para análise das estruturas das mitocôndrias foi realizada a observação sob microscopia eletrônica de transmissão (TEM), onde as amostras de córtex pré-frontal e hipocampo foram fixadas durante a noite com 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) mais 0,2 M de sacarose. O material foi pós-fixado com 1% de tetróxido de ósmio por 2 h, desidratado em série de gradiente de acetona e incorporado na resina de *Spurr*. Cortes finos foram corados com acetato de uranila aquoso (1%), seguido por citrato de chumbo (1%). Quatro repetições foram feitas para cada grupo experimental; duas amostras por replicação foram então examinadas sob TEM JEM 1011 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) a 80 kV. As estruturas encefálicas (córtex pré-frontal e hipocampo) foram examinados um mínimo de 8-10 campos aleatórios (para minimizar viés de amostragem não intencional) para uma análise qualitativa da morfologia mitocondrial.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão e comparadas pelo teste t-*Student* para amostras não pareadas ou análise de variância de uma

via (ANOVA) e teste *post hoc Tukey*. Todos os testes foram realizados com o SPSS versão 20 e / ou *GraphPad Prism 4.0*. Dados comportamentais da tarefa de esQUIVA inibit6ria e do 6ndice de reconhecimento de objetos foram expressos como mediana (intervalos interquartis), com compara66es entre grupos realizados usando o teste U de *Mann-Whitney*. Para as an6lises comportamentais, os grupos individuais de treino e teste foram comparados pelos testes de *Wilcoxon*. Diferen6as foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 A FUNÇÃO MITOCONDRIAL É COMPROMETIDA NO SNC DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA SEPSE

Para avaliar se a função mitocondrial foi comprometida no SNC após sepse foram mensurados os níveis de ATP no hipocampo e no córtex pré-frontal onde foram significativamente diminuídos tanto nas 24 horas quanto nos 10 dias após a sepse, quando comparados aos animais sham porém, os níveis não se mantiveram diminuídos em 3 dia (Figura 9A). Sabendo que os níveis cerebrais de ATP são mantidos principalmente pela respiração mitocondrial, o consumo de oxigênio mitocondrial também foi analisado *ex vivo* e aos 10 dias pós-CLP, as alterações nos níveis de ATP foram temporalmente relacionados a uma diminuição na respiração mitocondrial e no consumo de oxigênio, tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal, observou-se uma diminuição, uma vez que animais sépticos tem sua respiração diminuída e passam a consumir mais oxigênio após 10 dias (Figura 9B). não houve alterações tanto nos níveis de ATP quanto de oxigênio no tempo de 3 dias.

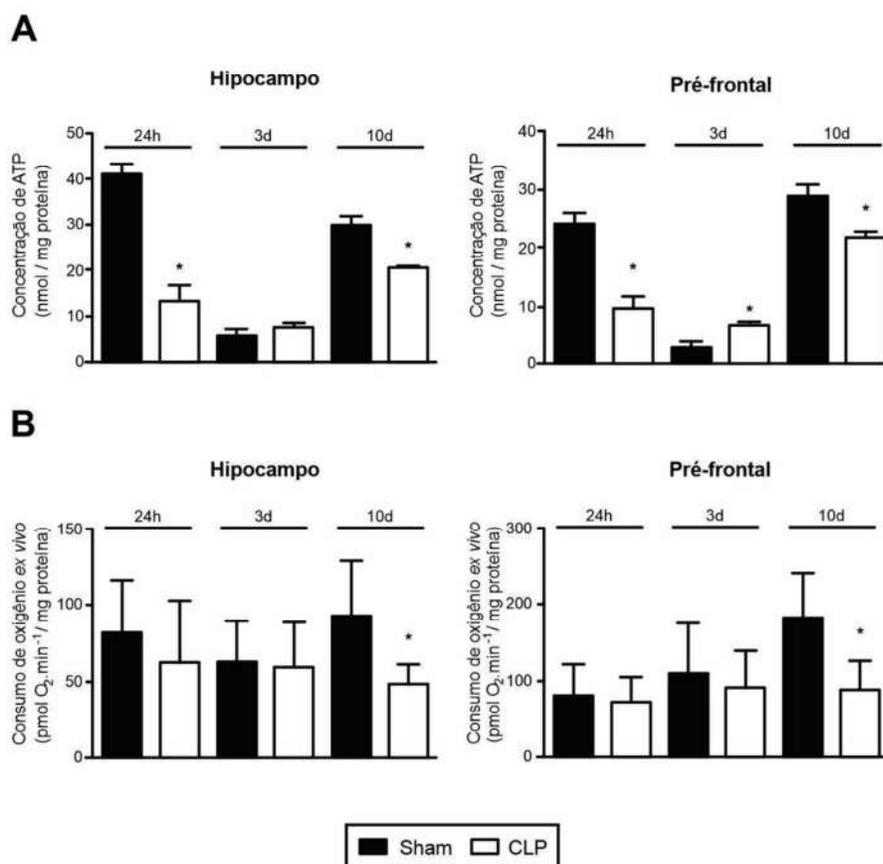


Figura 9: A evolução da função mitocondrial no cérebro durante o desenvolvimento da sepse. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham) e 24 horas, 3 e 10 dias após o hipocampo e córtex pré-frontal foram removidos para a determinação de (A) concentração de ATP (nmol/mg proteínas) (B) consumo de oxigênio *ex vivo* (pmol O₂·min⁻¹/mg proteína). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão * p < 0,05 em comparação com o grupo sham ao mesmo tempo. n = 7 animais por grupo.

Como essas alterações podem estar relacionadas à diminuição do conteúdo proteico mitocondrial, o conteúdo de proteínas mitocondriais, Mn-SOD e COX foi mensurado pós sepse. Em comparação com os animais sham, não houve alteração após a sepse em qualquer ponto de tempo analisado (Figura 10).

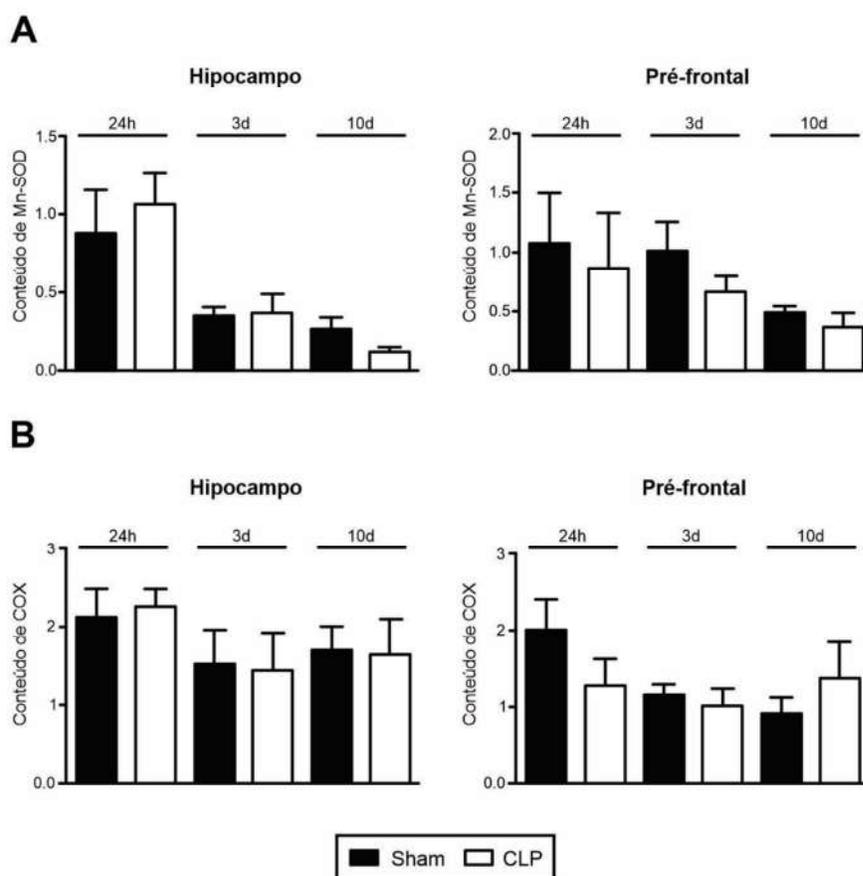


Figura 10: Conteúdo da SOD2 e COX no cérebro durante a evolução da sepse. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham) e 24 horas, 3 e 10 dias após o hipocampo e córtex pré-frontal foram removidos para a determinação de (A) SOD2 e (B) COX. Os dados foram expressos em ug/proteína de homogenato de tecido com média \pm desvio padrão * $p < 0,05$ em comparação com o grupo sham no mesmo tempo. $n = 7$ animais por grupo.

5.2 A DINÂMICA MITOCONDRIAL NÃO É REGULADA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA SEPSE

Como a falta de regulação positiva da dinâmica mitocondrial está associada a piores desfechos em pacientes sépticos segundo um estudo clínico de Carré et al., 2010, e em outro utilizando modelo animal de doença crítica (Haden et al., 2007), avaliou-se que os marcadores de autofagia e mitofagia mitocondriais estavam comprometidos após sepse. Não houve um padrão consistente no nível das diferentes proteínas ATG 16, ATG 12, ATG5 e ATG7 envolvidas na via da autofagia que pudessem estar relacionados com o desenvolvimento da sepse (Figura 11). Porém, a Beclina 1, uma proteína chave ligada à estrutura pré-autofagossômica e à formação de autofagossomos, sofreu uma redução 24 horas após a sepse em ambas estruturas analisadas, quanto aos 10 dias especificamente no córtex

pré-frontal (Figura 12A). No entanto, um aumento foi observado neste mesmo ponto no hipocampo. Da mesma forma, os conteúdos de ATG7 e LC3, as proteínas envolvidas no processo final de formação de autofagossomos, diminuiram significativamente no hipocampo, mas não no córtex pré-frontal nos 10 dias após a sepse (Figura 12B e Figura 12C). PINK (Figura 13A) e Parkin (Figura 13B), proteínas que regulam a via da mitofagia não foram modificadas em nenhum dos momentos analisados. Toda representação quantitativa das bandas das proteínas da via da autofagia e mitofagia realizados por W.B encontra-se em anexo 3.

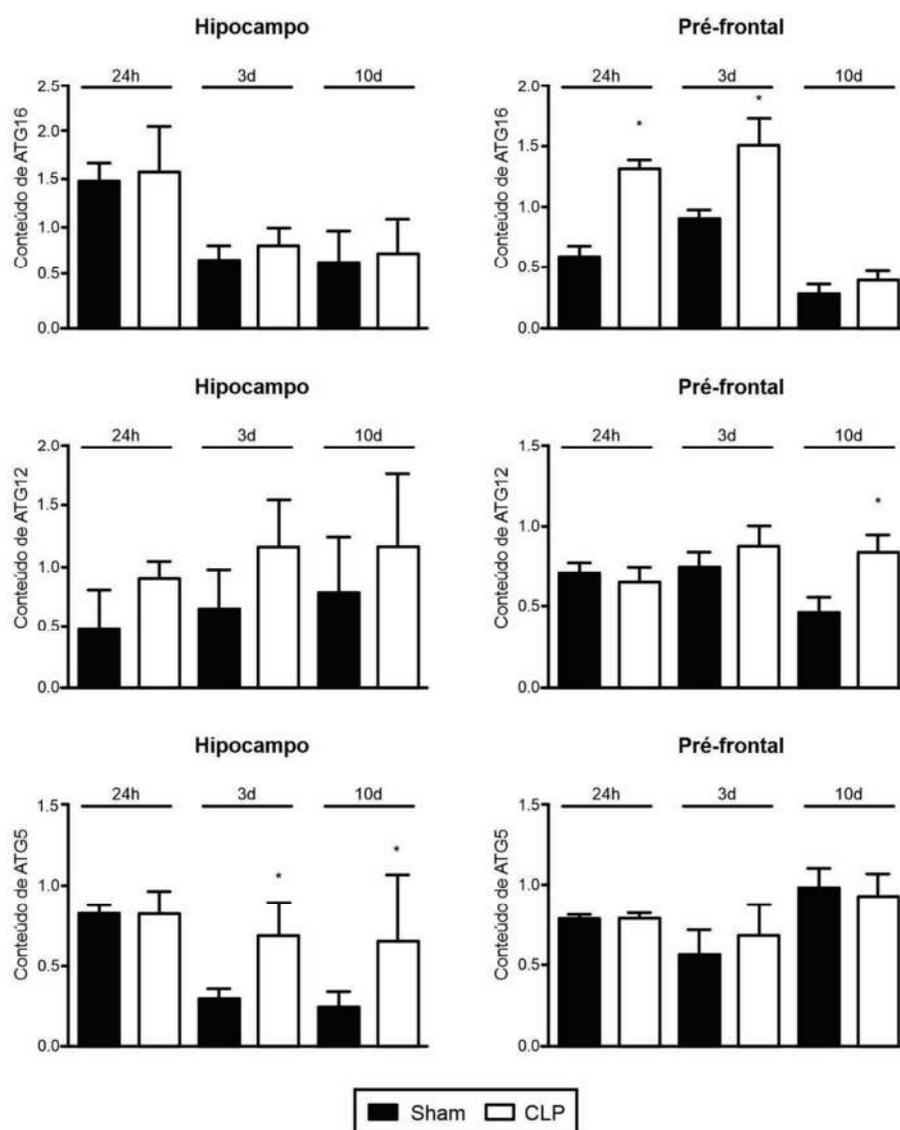


Figura 11: Expressão proteica dos marcadores de autofagia durante o desenvolvimento da sepse. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham) e 24 horas, 3 e 10 dias após o hipocampo e córtex pré-frontal foram removidos para a determinação da quantificação de ATG 16, ATG12, ATG5. Os dados foram expressos em

ug/proteína de homogenato de tecido com média \pm desvio padrão * $p < 0,05$ em comparação com o grupo sham ao mesmo tempo. $n = 7$ animais por grupo.

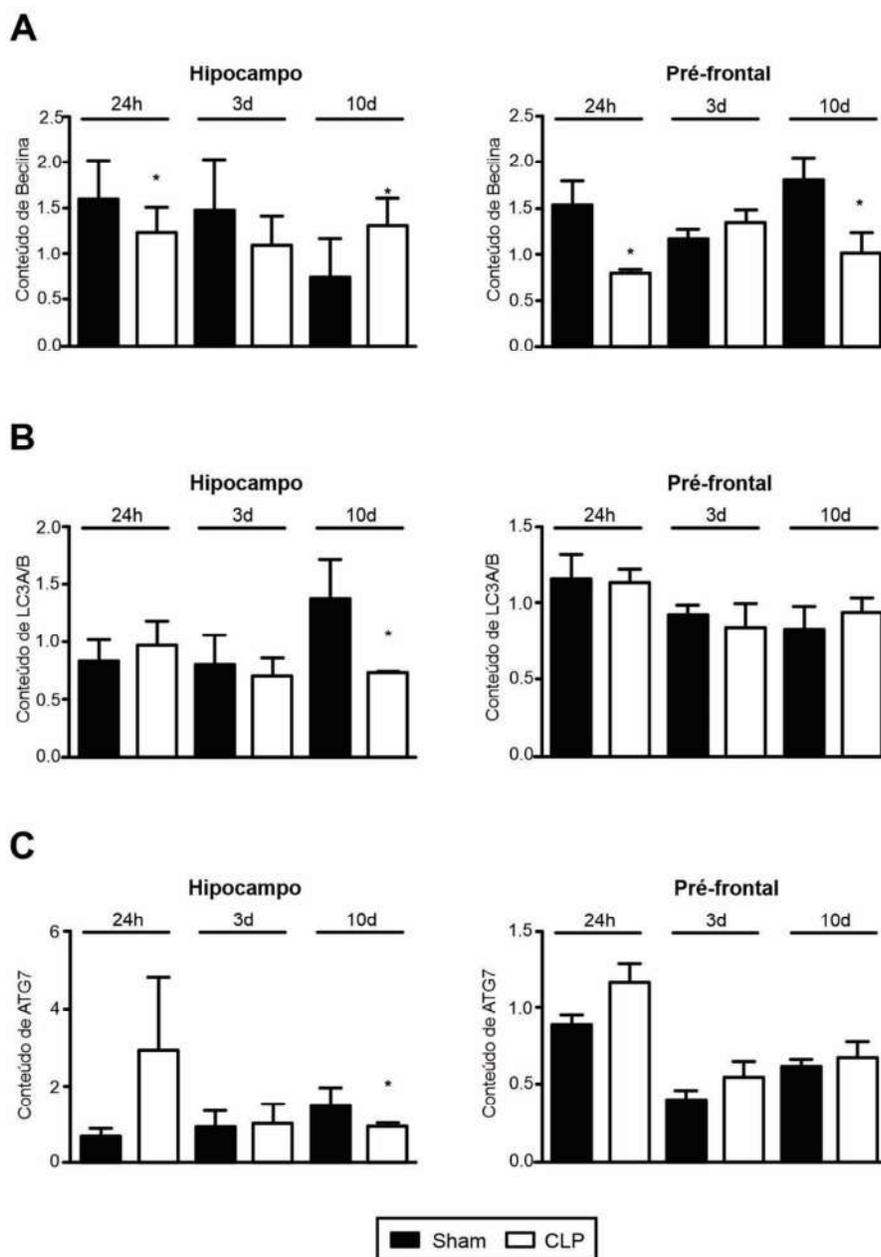


Figura 12: Expressão proteica dos marcadores da via da autofagia envolvidas na pré-formação e formação da estrutura autofagossômica durante o desenvolvimento da sepse. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham) e 24 horas, 3 e 10 dias após o hipocampo e córtex pré-frontal foram removidos para a determinação da quantificação de (A) Beclina, (B) LC3A/B, (C) ATG7. Os dados foram expressos em ug/proteína de homogenato de tecido com média \pm desvio padrão * $p < 0,05$ em comparação com o grupo sham ao mesmo tempo. $n = 7$ animais por grupo.

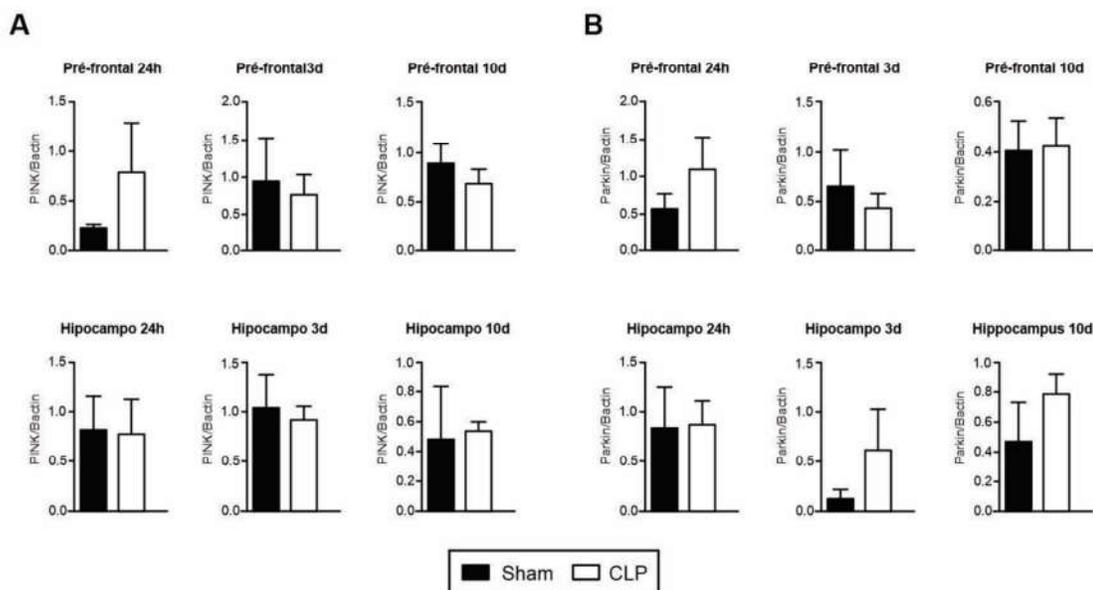


Figura 13: Quantificação gênica de marcadores de mitofagia durante o desenvolvimento da sepse. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham) e 24 horas, 3 e 10 dias após o hipocampo e córtex pré-frontal foram removidos para a determinação da quantificação de proteínas da via de mitofagia PINK e Parkin. Os dados expressos em ug/proteína de homogenato de tecido com média \pm desvio padrão * $p < 0,05$ em comparação com o grupo sham no mesmo tempo (n = 7 animais por grupo).

5.3 ATIVADORES DA AUTOFAGIA MITOCONDRIAL MELHORAM A FUNÇÃO MITOCONDRIAL APÓS SEPSE TARDIA

A expressão proteica dos marcadores da via da autofagia envolvidas na pré-formação e formação dos autofagossomas no desenvolvimento da sepse foram avaliados após o tratamento com os ativadores de autofagia mitocondrial, que foram administrados do 7º ao 9º dia após a sepse para avaliar seus efeitos na função mitocondrial. Tanto a rapamicina quanto a rilmenidina reverteram a redução dos níveis de ATP no cérebro e consumo de oxigênio *ex vivo* (Figura 14).

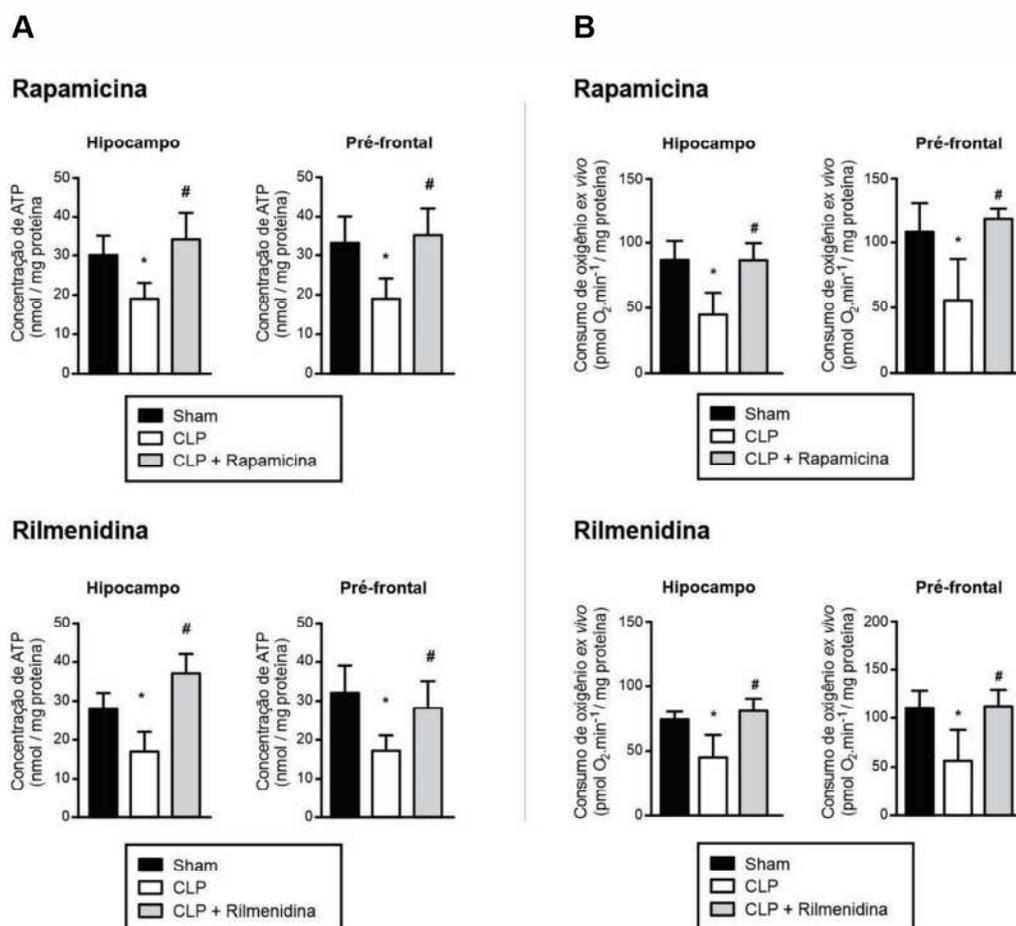


Figura 14: Efeito de ativadores da autofagia na função mitocondrial cerebral após sepse tardia. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham). Nos dias 7-9, após a indução de sepse os animais foram tratados com os fármacos (rilmenidina ou rapamicina), dose única diária de 5µl via icv. No dia 10, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram removidos para determinar o nível de ATP (A) tratadas com rapamicina e rilmenidina; e o consumo *ex vivo* de oxigênio (B) tratadas com rilmenidina e rapamicina. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão * $p < 0,05$ em comparação com o grupo sham e # comparando o grupo CLP com os grupos tratados com rapamicina e rilmenidina respectivamente (n = 7 animais por grupo).

Para entender melhor os efeitos do tratamento com os ativadores da autofagia (rapamicina e rilmenidina) na função mitocondrial, foram avaliadas as atividades do complexo da cadeia respiratória mitocondrial e enzimas do ciclo de Krebs (citrato quinase e succinato desidrogenase). Os ativadores de autofagia reverteram para alguns complexos (I, II e II-III) cadeia respiratória mitocondrial (Figura 15) nas duas estruturas (hipocampo e córtex pré-frontal) e somente córtex pré-frontal para complexo IV.

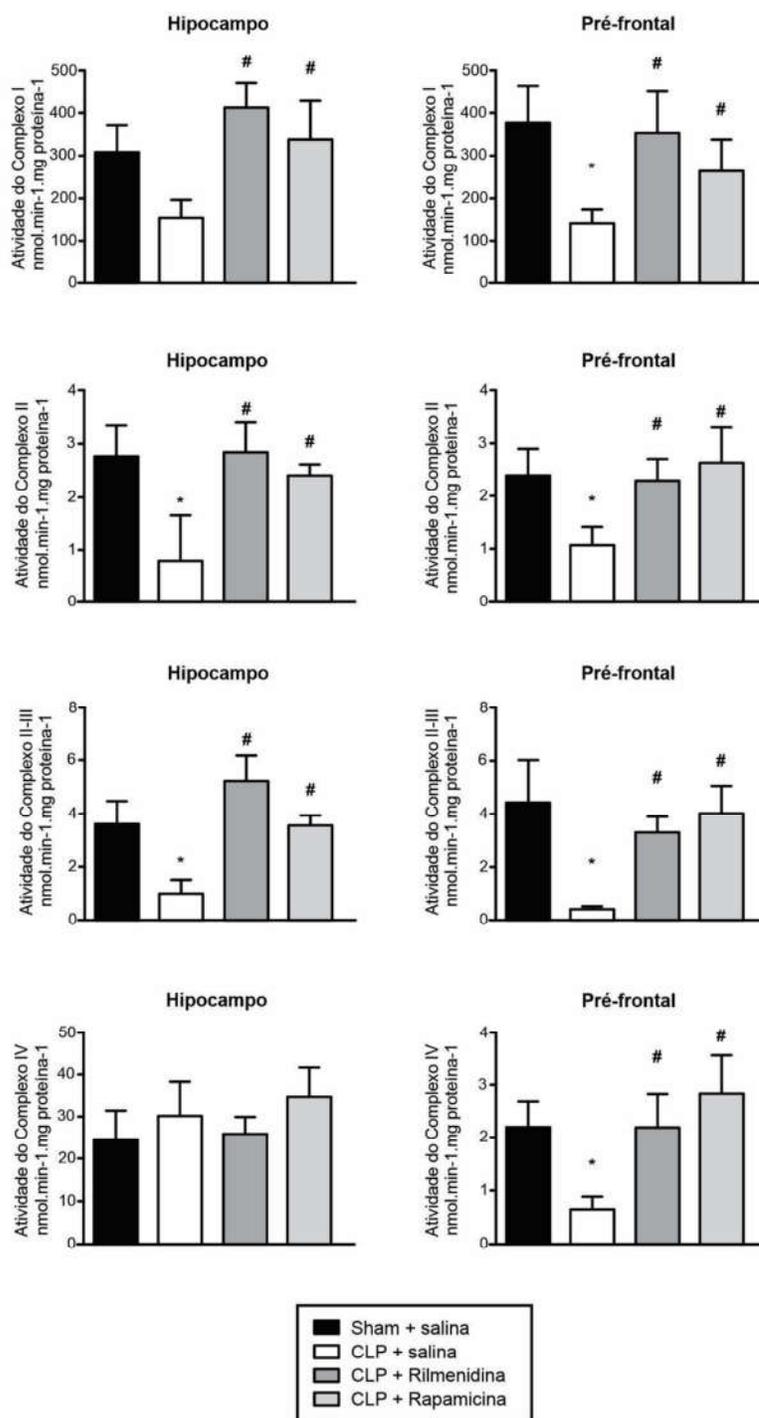


Figura 15: O efeito de ativadores da autofagia mitocondrial nas atividades cerebrais nas atividades dos complexos (I, II, II-II e IV) da cadeia respiratória após sepse tardia. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham). Nos dias 7-9, após a indução de sepse, os animais foram tratados com os fármacos (rilmenidina ou rapamicina), dose única diária de 5µl via icv. No dia 10, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram removidos para determinar as atividades das enzimas do ciclo de Krebs (citrato sintase e succinato desidrogenase). Os dados são expressos como média ± desvio padrão * p < 0,05 em comparação com o grupo sham ao mesmo tempo #

comparando o grupo CLP com os grupos tratados com rapamicina e rilmenidina respectivamente (n = 7 animais por grupo).

A atividade cerebral da enzima citrato sintase apresentou-se significativamente diminuída na sepse tardia, porém, após tratamento com rapamicina sua atividade foi revertida com aumento de sua expressão na estrutura do córtex pré-frontal, mas não no hipocampo, quando comparada com o grupo CLP.

Por outro lado, a atividade cerebral da enzima succinato desidrogenase foi revertida após tratamento com rilmenidina tanto no córtex pré-frontal, quanto no hipocampo, quando comparada com o grupo CLP após sepse tardia (Figura 16).

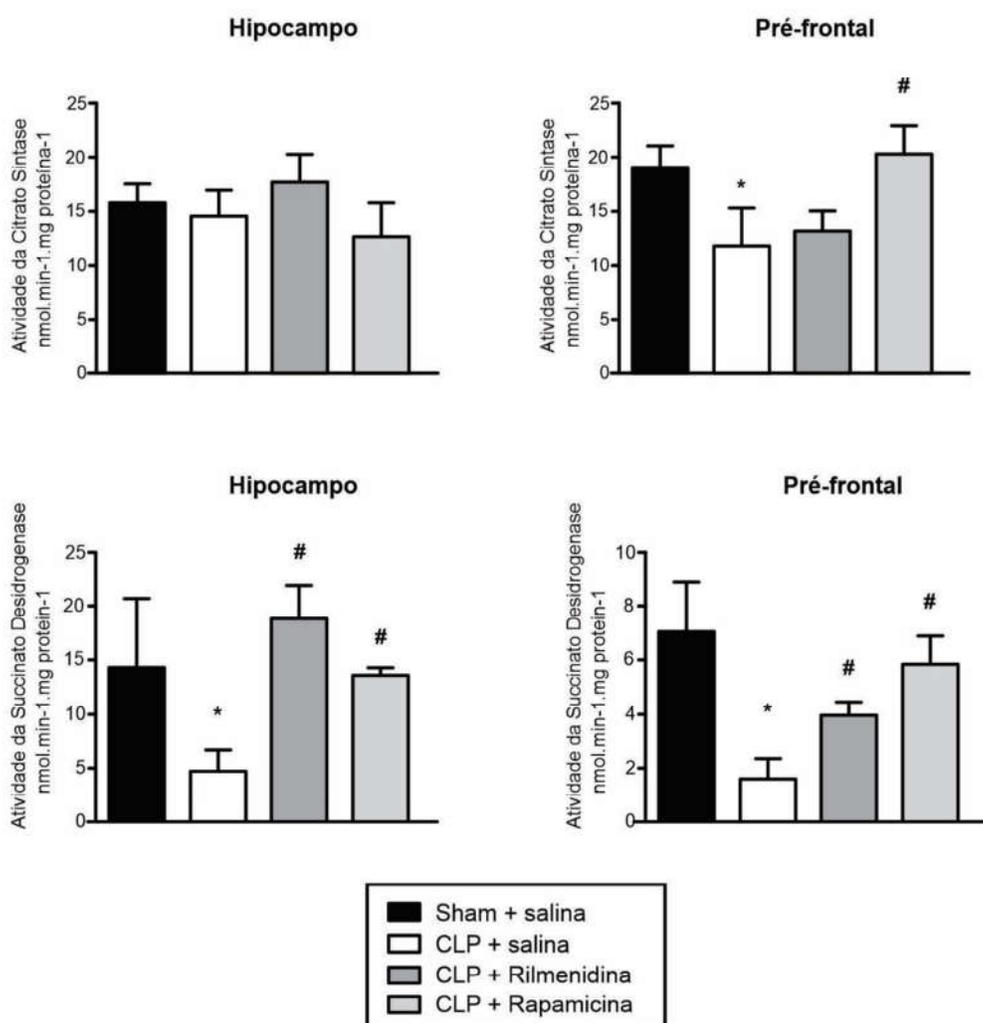


Figura 16: O efeito de ativadores da autofagia mitocondrial nas atividades cerebrais das enzimas do ciclo de Krebs no cérebro após sepse tardia. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham). Nos dias 7-9, após a indução de sepse, os animais foram tratados com os fármacos (rilmenidina ou rapamicina), dose única diária de 5µl via icv. No dia 10, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram removidos para determinar as atividades das

enzimas do ciclo de Krebs (citrato sintase e succinato desidrogenase). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão * $p < 0,05$ em comparação com o grupo sham # comparando o grupo CLP com os grupos tratados com rapamicina e rilmenidina respectivamente $n = 7$ animais por grupo.

5.4 ATIVADORES DA AUTOFAGIA MITOCONDRIAL DIMINUÍRAM A OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS APÓS SEPSE TARDIA

Uma das principais funções da autofagia é reciclar componentes macromoleculares, e restos de proteínas oxidadas que podem, eventualmente, ficar acumuladas na mitocôndria. Para avaliar o dano oxidativo em hipocampo e córtex pré-frontal determinou-se os níveis de proteínas carboniladas. Tanto o tratamento com rilmenidina e rapamicina diminuiu um aumento no marcador de dano oxidativo, porém não significativamente, após a sepse em ambas estruturas cerebrais (Figura 17).

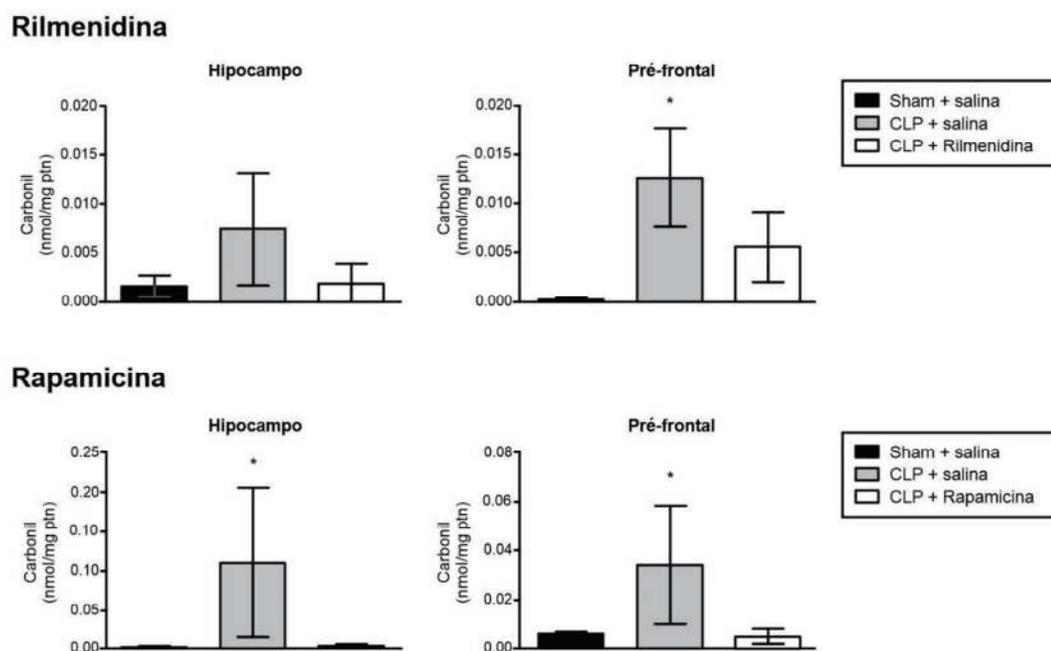


Figura 17: Efeito do tratamento com ativadores da autofagia em dano oxidativo em proteínas após sepse tardia. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham). Nos dias 7-9, após a indução de sepse, os animais foram tratados com os fármacos (rilmenidina ou rapamicina), dose única diária de 5 μ l via icv. No dia 10, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram removidos para determinar a carbonilação de proteínas. Os dados foram como nmol/mg de proteína para 7 amostras independentes realizadas em duplicata (média+desvio padrão) ($n=7$ por grupo), * diferente do controle (sham+salina) $p < 0,05$.

Além disso, apenas a rapamicina foi capaz de reverter a diminuição na razão mtDNA/gDNA quando comparados ao grupo CLP que, apresentou-se significativamente comprometido quando comparados ao grupo controle (Figura 18). Esta melhora na razão,

estava completamente de acordo com as imagens da ultraestrutura da mitocôndria representadas na (Figura 19) onde, a imagem da (Figura 19A) representou o tratamento do grupo sham; na (Figura 19B) demonstrou o edema mitocondrial fruto do processo inflamatório desencadeado pela sepse; na (Figura 19C) representou a redução de cristas mitocondriais que foram observadas em animais CLP que foram melhorados principalmente pelo tratamento com rapamicina e, em menor grau, pela rilmenidina (Figura 19D) sobre a ultraestrutura da mitocôndria.

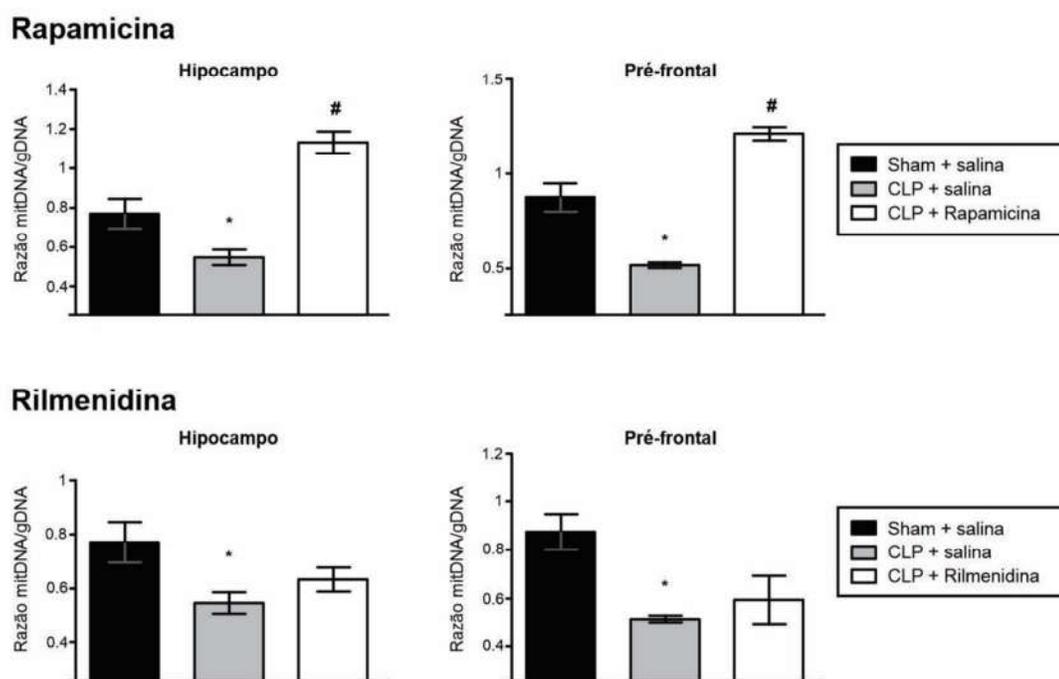


Figura 18: O efeito de ativadores de autofagia mitocondrial no genoma cerebral na sepse tardia. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham). Nos dias 7-9, após a indução de sepse, os animais foram tratados com os fármacos (rilmenidina ou rapamicina), dose única diária de 5µl via icv. No dia 10, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram removidos para determinar a razão de mtDNA/gDNA. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham; # comparado ao grupo CLP. $n = 7$ animais por grupo.

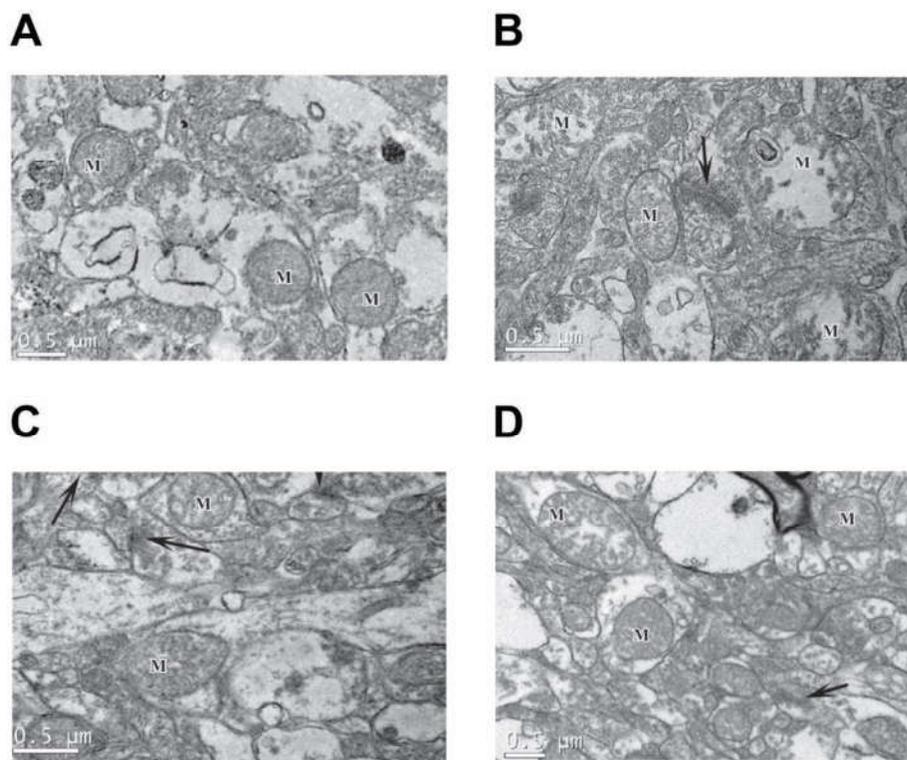


Figura 19: O efeito de ativadores de autofagia mitocondrial nas mitocôndrias cerebrais na sepse tardia. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham). Nos dias 7-9, após a indução de sepse, os animais foram tratados com os fármacos (rilmenidina ou rapamicina), dose única diária de 5µl via icv. No dia 10, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram removidos para captar as imagens da ultraestrutura mitocondrial por microscopia eletrônica de transmissão representados por animais sham (A), CLP (B), CLP-rapamicina (C) e CLP-Rilmenidina (D).

5.4 ATIVADORES DE AUTOFAGIA MELHORAM O DÉFICIT COGNITIVO À LONGO PRAZO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

Entende-se que melhorar a função mitocondrial, decorrente do desenvolvimento da sepse tardia, pode resgatar animais de déficits cognitivos em diferentes modelos (Petez-Pinzon e Stetler., 2012) assim, também foi avaliado o efeito de indutores de autofagia no desempenho de animais CLP em duas tarefas cognitivas diferentes em memória de longa duração. Todos os tratamentos (rapamicina e rilmenidina), aumentaram o desempenho na esQUIVA inibitória através do tempo de latência de longa duração e no reconhecimento de objetos dos animais sépticos tardios (Figura 20).

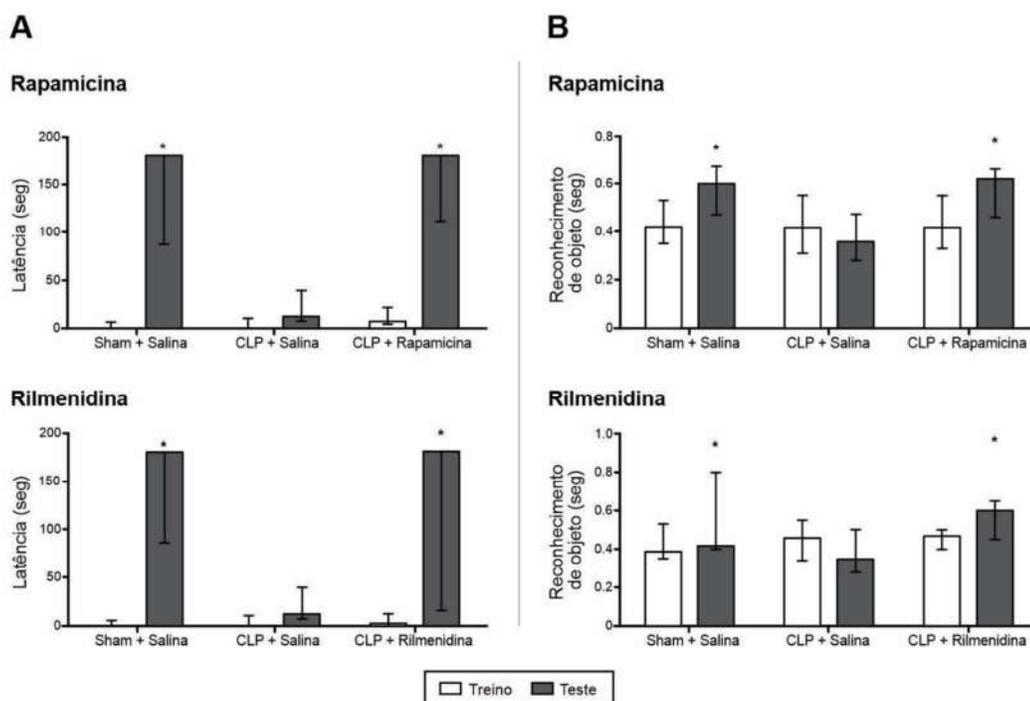


Figura 20: O efeito de ativadores de autofagia mitocondrial em déficits cognitivos à longo prazo em sobreviventes à sepse. Sepse foi induzida pelo modelo de CLP (ou sham). Nos dias 7-9, após a indução de sepse, os animais foram tratados com os fármacos (rilmenidina ou rapamicina), dose única diária de 5µl via icv. No dia 10, os animais foram submetidos a treino e testes comportamentais de (A) esquina inibitória e (B) tarefas de reconhecimento de objetos. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartilico * $p < 0,05$ em comparação com a seção de treino ($n = 10$ animais por grupo).

5.5 RESUMO DOS RESULTADOS BIOQUÍMICOS, IMUNOQUÍMICOS, MOLECULARES E COMPORTAMENTAIS

As tabelas 1 e 2 apresentam o resumo dos resultados dos resultados obtidos nos Protocolos I e II, respectivamente.

Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos no Protocolo I

PROTOCOLO I	24 horas		3 dias		10 dias	
	HC	PF	HC	PF	HC	PF
Concentração de ATP	↓	↓	-	↓	↓	↓
Consumo de O ₂	-	-	-	-	↓	↓
Conteúdo de Mn-SOD	-	-	-	-	-	-
Conteúdo de COX	-	-	-	-	-	-
Conteúdo de ATG16	-	↑	-	↑	-	-
Conteúdo de ATG12	-	-	-	-	-	-
Conteúdo de ATG5	-	-	↑	-	↑	-
Conteúdo de ATG7	-	-	-	-	↓	-
Beclina	↓	↓	-	-	↑	↓
LC3A/B	-	-	-	-	↓	-
PINK	-	-	-	-	-	-
Parkin	-	-	-	-	-	-

Lista de abreviaturas: hipocampo (HC), córtex pré-frontal (PF)

Tabela 2: Resumo dos resultados obtidos no Protocolo II

PROTOCOLO II	RAPAMICINA		RILMENIDINA	
	HC	PF	HC	PF
Concentração de ATP	↑	↑	↑	↑
Consumo de O ₂	↑	↑	↑	↑
Complexo I	↑	↑	↑	↑
Complexo II	↑	↑	↑	↑
Complexo II-III	↑	↑	↑	↑
Complexo IV	-	↑	-	↑
Citrato Sintase	-	↑	-	↑
Succinato Desidrogenase	↑	↑	↑	↑
Carbonil	-	-	-	-
Razão mtDNA/gDNA	↑	↑	-	-
Esquiva inibitória	↑	↑	↑	↑
Reconhecimento de objeto	↑	↑	↑	↑

Lista de abreviaturas: hipocampo (HC), córtex pré-frontal (PF)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo sugere um importante papel da dinâmica mitocondrial na disfunção cognitiva em animais sobreviventes a sepse tardia.

Inicialmente, no Protocolo I, procurou-se estabelecer uma análise temporal para avaliar a cinética da disfunção mitocondrial após indução do modelo CLP. Para isso, estipulou-se uma curva temporal de 24 horas, 3 e 10 dias e, observou-se em quais tempos a disfunção mitocondrial apresentou-se significativamente comprometida. Como as análises preliminares de nível de ATP e consumo de oxigênio *ex vivo* não apresentaram alterações significativas constantes no tempo de três dias e, esse resultado persistiu em não apresentar significância na quantificação das proteínas da via da autofagia e mitofagia, estabeleceu-se que esse tempo (3 dias) fosse excluído para as próximas etapas, uma vez que não houveram alterações consistentes nos resultados dos parâmetros aqui estudados. A partir dos resultados obtidos no protocolo I, deu-se início ao Protocolo II, onde foi estabelecido o tempo de 10 dias representou a sepse tardia, conforme estudo prévio de Barichello et al, 2007 e, envolveu todo o tratamento com os ativadores da autofagia, com o intuito a promover a reversão dos parâmetros relacionados à disfunção mitocôndria e suas consequências cognitivas à longo prazo. Por essa razão, a discussão desse estudo ficou grande parte voltada para a sepse tardia onde, maior parte dos resultados mostraram-se significativos e, foram de encontro com os achados de um estudo de sobreviventes sépticos já estabelecidos na literatura à longo prazo (Carré et al, 2010).

A inflamação pode alterar o metabolismo de neurotransmissores, bem como induzir a disfunção mitocondrial, que são vias relevantes no desenvolvimento da ES (Bozza et al., 2013; Dal-Pizzol et al., 2014). Visto que este modelo animal de longo prazo da sepse houve uma função mitocondrial comprometida e nenhuma ativação de autofagia e mitofagia à longo prazo. Uma vez que estes são processos chave durante a recuperação, houve disfunção mitocondrial sustentada que foi temporalmente relacionada ao comprometimento cognitivo. Curiosamente, diferentes ferramentas farmacológicas que ativam a autofagia aumentam os níveis de ATP no cérebro e o consumo de oxigênio, melhorando o comprometimento cognitivo a longo prazo.

O conceito de disfunção mitocondrial e falha bioenergética durante a sepse não é novo (Nogueira et al., 2001; Brealey et al., 2004). A fosforilação oxidativa é rigidamente controlada pelo consumo de ATP (Nogueira et al., 2001). Condições onde há

comprometimento de seu estoque energético, é crucial para célula onde, passa a responder prontamente às mudanças na demanda de energia celular (Singer, 2008). Dado ao estado de fluxo dinâmico e de alta energia que o organismo necessita para exercer suas funções metabólicas e celulares, não é surpreendente que as mitocôndrias exercem um papel de destaque na manutenção energética celular, uma vez que são as principais consumidoras de oxigênio tecidual e também a maior fonte de ATP dentro do organismo. Entende-se que mecanismos que possam favorecer a oferta e demanda energética altamente eficientes podem permitir uma resposta imediata às mudanças nos requisitos metabólicos. Estudos com pacientes e animais encontraram uma clara associação entre o grau de disfunção mitocondrial, a gravidade da disfunção orgânica e a mortalidade (Brealey et al., 2002; Bozza et al., 2013; Fink., 1990).

A mitocôndria tem um papel central no metabolismo respiratório e energético da célula, contribuindo para o metabolismo intermediário e para os mecanismos de morte celular. Além dessas várias funções, mitocôndrias se destacam de outras organelas celulares por possuírem seu próprio genoma (mtDNA), distinto do DNA nuclear. 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).

Diversos estudos mostraram que o cérebro é altamente dependente da fosforilação oxidativa e foi anteriormente demonstrado que a disfunção mitocondrial cerebral ocorre precocemente após a sepse (Lyu et al., 2015; Comim et al., 2008; d'Ávila et al., 2008; Hill et al., 2015). Além disso, há uma diminuição nas atividades do complexo I e succinato desidrogenase (Comim et al., 2008 d'Ávila et al., 2008). Navarro e Boveris (2007) relataram que o aumento no dano oxidativo mitocondrial e na atividade da CK ocorreu quando os animais apresentaram sinais de disfunção no SNC. Sendo assim, é provável que a disfunção cerebral na sepse possa estar associada ao estresse oxidativo e que o aumento de citocinas inflamatórias pode levar à disfunção no complexo I, resultando no dano oxidativo e comprometendo a capacidade cognitiva. Curiosamente, a rapamicina e rilmenidina reverteram a inibição de alguns dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, provavelmente relacionados a uma reversão a redução dos níveis de ATP no cérebro e ao consumo de oxigênio *ex vivo*.

Uma vez que os danos cognitivos podem surgir à longo prazo pós sepse, interessou-se pela bioenergética cerebral mais tardia após a sepse, uma vez que os resultados preliminares do protocolo I direcionaram para o tempo de 10 dias pós sepse para os

parâmetros de disfunção mitocondrial. Neste contexto, em um modelo animal de doença crítica de longo prazo, foi demonstrado que o consumo global de oxigênio e a taxa de troca respiratória foram reduzidos (Hill et al., 2015). Nas células satélites musculares isoladas de um modelo animal de sepse (Rocheteau et al., 2010), houve anormalidades energéticas sustentadas semelhantes às relatadas no cérebro. Assim, há plausibilidade de que a falha bioenergética persistente possa explicar parcialmente o comprometimento cognitivo à longo prazo observado na sepse, como demonstrado neste estudo nos tempo de 24 horas e 10 dias pós sepse.

Dados de estudos experimentais e clínicos demonstraram que a sepse está relacionada ao aumento da produção de ERO e acúmulo de marcadores de dano oxidativo (Boczkowski et al., 1999; Abd El-Gaward e Khalifa, 2001; Crouser et al., 2004; D'Avilla et al., 2008). Desta forma, a resposta inflamatória na sepse poderia induzir o estresse oxidativo, levando a disfunção mitocondrial, com consequente morte celular (Galley., 2011).

O cérebro é frequentemente exposto às ERO, devido ao seu alto consumo de oxigênio (Halliwell, 2006) e, durante a sepse, parece ser um dos primeiros órgãos a ser afetado (Wilson, 2009; Comim et al., 2011). Os neurônios são as células mais dependentes de oxigênio dentre os tipos celulares do SNC (Berg et al., 2011) e a degeneração mitocondrial e apoptose têm sido observadas em diferentes regiões cerebrais de indivíduos sépticos e também em modelos animais (Papadopoulos et al., 2000; Semmler et al., 2005; Barichello et al., 2007; Steckert et al., 2014).

Chuang e colaboradores em 2012 demonstraram em estudo de modelo animal de sepse que os ratos sépticos tiveram um aumento na produção de (O^{2-}) no tecido cerebral. Adicionalmente, níveis aumentados de NO e de ONOO⁻ no cérebro desempenham um papel crítico na função neuronal na sepse (Berg et al., 2011). Em duas horas após a administração de LPS foi observado um aumento de ERO no cérebro dos ratos (Abd El-Gaward e Khalifa, 2001). Além disso, utilizando um modelo animal induzido por CLP, Barichello e colaboradores (2006) demonstraram que o dano oxidativo cerebral ocorre em tempos iniciais da sepse. Estas alterações oxidativas persistem por até 10 dias após a indução da sepse (Comim et al., 2011). Neste estudo, foi encontrado um aumento nos níveis de grupos carbonila em hipocampo e córtex pré-frontal no grupo CLP em relação ao grupo sham. Considerando que estes resultados corroboram dados encontrados na literatura, um fato importante seria que algumas regiões cerebrais são particularmente susceptíveis ao dano oxidativo. Considerando que a carbonilação proteica é amplamente utilizada como marcador

de dano oxidativo e quantificação dos conteúdos proteicos geralmente são mais estáveis quando comparadas a oxidação lipídica pela exposição dos ácidos graxos poliinsaturados à oxidação por radicais livres (Ferreira e Matsubara, 1987). Não foi utilizado demais marcadores de dano oxidativo, uma vez não ser o objetivo desse estudo limitar-se ao estresse oxidativo. Porém, já com os resultados obtidos após tratamento com os marcadores da autofagia, foi possível demonstrar que tanto a rapamicina, quanto a rilmenidina conseguiram amenizar o dano oxidativo após sepse tardia.

Uma adaptação de longo prazo às mudanças no ATP é obtida pela modificação do número ou atividade das mitocôndrias funcionais (Hotchkiss et al., 2009). Esses mecanismos utilizam a autofagia como uma estratégia que as células utilizam para sobreviver frente a uma situação de estresse. Embora este processo não esteja completamente esclarecido, entende-se que ela pode servir como um mecanismo de adaptação celular quando existe baixa demanda bioenergética ou diminuição do aporte de nutrientes como ocorre nos processos de diferenciação (Kuma et al., 2004; Uchiyama et al., 2008).

O reparo deficiente ou a falha em regular esses mecanismos em situações de dano mitocondrial levam ao acúmulo de mitocôndrias danificadas, ao comprometimento do fornecimento de substrato energético e, por fim, à disfunção celular e morte (Terman et al., 2010; Suliman e Piantadosi., 2014). Sabe-se que a biogênese mitocondrial envolve a produção de proteínas mitocondriais codificadas seja por DNA nuclear, com subsequente intergração nas mitocôndrias ou via DNA mitocondrial, que codifica 13 proteínas situadas principalmente dentro da fosforilação oxidativa. Portanto, é ela que regula o genoma mitocondrial, regulação do conteúdo e morfologia mitocondrial (Hood et al., 2006; Ryan et al 2007) e melhora a capacidade de produção de substrato energético se a demanda de energia aumentar com o tempo (Singer., 2014).

A autofagia também desempenha um papel crucial na progressão do câncer. Um aumento no dano ao DNA e instabilidade gênica detectada em células com perda monoalélica de Beclina 1 ou perda bi-alélica ATG 5 que podem explicar as funções supressoras de tumor de proteínas autofágicas (Mathew et al., 2007). Paradoxalmente, a autofagia pode fornecer aos tumores uma ferramenta para resistir ao estresse metabólico durante a autofagia. Além disso, a autofagia desempenha um papel importante na imunidade inata e adaptativa, provavelmente na degradação do patógeno, para posterior apresentação de antígenos (Levine e Deretic., 2007). Os resultados desse estudo demonstraram as proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial cerebral (ATG 16, ATG 12, ATG7, ATG 5) não foram reguladas

durante o desenvolvimento da sepse, essa falta de regulação positiva tem sido associada a piores desfechos em estudo clínico (Carré, 2010) e em modelo animal de doença crítica (Haden et al., 2007).

Por outro lado, a proteína chave ligada à estrutura pré-fagossômica e à formação de autofagossomos, Beclina 1, sofreu uma redução nas 24 horas após sepse e sua redução prorrogou-se até os 10 dias na estrutura de hipocampo analisada nesse estudo, uma vez já sabido que a autofagia é um processo de degradação proteica através de uma via autofagomática (Feng., 2014; Harris e Rubinsztein., 2012) da mesma forma, as concentrações de Atg 7 e LC3/AB, ambas proteínas envolvidas no processo final de autofagossomos, diminuíram significativamente no hipocampo, 10 dias após sepse. Desta forma, conclui-se que as proteínas relevantes que regulam a via da autofagia (Beclina e LC3/AB), mostraram-se comprometidas após o insulto séptico, porém, mais estudos serão necessários.

A relação cruzada entre a inflamação e esses processos recentemente atraiu a atenção (Suliman e Pintadosi, 2016). Em um modelo de doença crítica, o fenótipo de autofagia insuficiente foi mais pronunciado em animais não sobreviventes com função mitocondrial comprometida e dano de órgão mais grave (Gunst et al., 2013). A perda óssea induzida também parece estar relacionada a autofagia insuficiente e a hipometilação por histonas (Owen et al., 2015). A eliminação incompleta de componentes celulares danificados devido à autofagia insuficiente também é relatada em pacientes gravemente doentes (Vanhirebeek et al., 2011). Especificamente no cérebro, a autofagia encontra-se deprimida no hipocampo logo após o início da sepse, e isso está relacionado à inflamação do cérebro pela via de sinalização do fator nuclear kappa B (NFkB) (Su et al., 2015). Mais uma vez, não foi encontrado ainda em nenhuma evidência na literatura anterior sobre a dinâmica mitocondrial deficiente no cérebro tardiamente após a sepse. Este estudo demonstrou que existe uma associação temporal entre a disfunção energética e a falta de regulação positiva da dinâmica mitocondrial. Isso é pertinente, e se torna cada vez mais relevante, pois evidências recentes implicam que a dinâmica mitocondrial desempenha um papel crucial em numerosas doenças neurodegenerativas (Cieri et al., 2007) e foi demonstrado anteriormente que há semelhanças com a disfunção cerebral a longo prazo após a sepse (Barichello et al., 2015).

Na mitocôndria o 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). Estudos sobre o mecanismo molecular da mitofagia em resposta ao dano mitocondrial foi induzido pela super expressão de Parkin à longo prazo o que promoveu a eliminação de mitocôndrias danificadas (Novak et al., 2010; Ding et al., 2010). Porém, para esse estudo não houve regulação via mitofagia pela expressão das proteínas PINK/Parkin.

Uma vez que a regulação da dinâmica mitocondrial é um aspecto essencial para a recuperação de diferentes doenças, estratégias farmacológicas ajudam a entender melhor o seu papel nos diferentes processos patológicos e o seu potencial papel na neuroproteção com novos alvos mitocondriais para neuroproteção estão sendo estudados (Perez-Pinzono., 2012). Certo de que um controle mitocondrial inadequado é proposto como um dos mecanismos que explicam a falta de recuperação da falência de órgãos em pacientes gravemente enfermos (Vanhorebeek et al., 2011; Zhang et al., 2018), foi examinado se a regulação positiva farmacológica da dinâmica mitocondrial pode impactar na disfunção cerebral induzida pela sepse. A autofagia é regulada por vias independentes e dependentes de mTOR, que possuem múltiplos componentes que poderiam ser direcionados para a manipulação terapêutica de doenças neurodegenerativas. A rapamicina é amplamente utilizada como um inibidor canônico de mTORC1 (Kim e Guan., 2015) enquanto que a rilmenidina, um análogo de rapamicina, é um indutor de autofagia independente de mTOR (Freke et al., 2015). Esta abordagem terapêutica também foi demonstrada em modelos animais de doença crítica, demonstrando ter efeitos benéficos no contexto das doenças neurodegenerativas podendo proteger os neurônios de apoptose (Ravikumar et al., 2006; Fleming et al., 2010; Ravikumar et al., 2004).

A ativação da autofagia atenuou a lesão hepática após isquemia-reperfusão, restaurando a massa mitocondrial e o potencial de membrana (Khader et al., 2016). Outro estudo demonstrou que logo após a sepse, a ativação da autofagia melhorou a sobrevivência e diminuiu a lesão pulmonar aguda (Yen et al., 2013). Este estudo demonstrou que diferentes ativadores da autofagia foram capazes de melhorar os níveis tardios de ATP e consumo de oxigênio *ex vivo*. Reforçando a ideia que o insucesso da bioenergética está relacionado com uma ineficiente dinâmica mitocondrial. Mais importante, todos os tratamentos melhoraram essas deficiências observadas no protocolo I. Isto é, até onde sabe-se, é a primeira

demonstração do efeito benéfico sobre a função cerebral da ativação da autofagia na recuperação da disfunção cerebral tardiamente após a resolução da sepse.

Dois ensaios recentes não conseguiram demonstrar uma evolução na recuperação a longo prazo de uma doença crítica, utilizando estratégias de reabilitação não farmacológica baseadas no hospital ou na atenção primária (Walsh et al., 2016; Griffith et al., 2016). A falha na recuperação de uma doença crítica pode resultar de inflamação persistente (Walsh et al., 2016), falha bioenergética (White e Murphy., 2010), reparo anormal e remodelação (White e Murphy., 2010). Este estudo reforça essa hipótese. Assim, os achados obtidos neste trabalho, em que intervenções farmacológicas tardias, iniciadas uma semana após a sepse, ainda poderiam restaurar a função cerebral durante a fase de recuperação, podem ser clinicamente relevantes.

Como a ativação da autofagia apresentou melhores resultados à função mitocondrial e conseqüentemente diminuição do dano cognitivo à longo, entende-se que uma falha produção bioenergética de níveis de ATP e oxigênio teciduais, assim como a diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, podem ser centrais no comprometimento cerebral tardio. Este estudo demonstrou que tanto a rapamicina quanto a rilmenidina foram capazes de aumentar as atividades de alguns complexos da cadeia respiratória mitocondrial (complexo I, II, II-III). Por essa razão, entende-se mais estudos sobre diferentes efeitos estratégicos farmacológicos aqui estudados, seja pela via dependente de mTOR (rapamicina), ou pela via independente da mTOR (rilmenidina), devem ser realizados para uma melhor compreensão de seus efeitos sobre a função cerebral durante o desenvolvimento da sepse.

Algumas limitações do estudo devem ser observadas. Primeiramente, ativadores de autofagia foram administrados via injeção *ivc*. Enquanto isso limita a aplicação clínica destes resultados, todas as drogas podem ser administradas sistemicamente ao homem. No entanto, do ponto de vista mecanicista, diminui a probabilidade de um efeito sistêmico e não específico. Quando administrados sistemicamente, esses medicamentos se mostraram eficazes em diferentes modelos animais, embora o tempo e a duração ideais da administração sejam pouco compreendidos. Estudos adicionais são claramente necessários para definir a amplitude da janela terapêutica quando administrada sistemicamente.

Segundo que, nenhum dos fármacos usados neste estudo, tem efeitos específicos sobre a dinâmica mitocondrial, e isso pode ter um impacto de diferentes efeitos cerebrais no tratamento com os fármacos observados aqui. No entanto, entende-se que a melhora na função

mitochondrial implica na diminuição da disfunção mitocondrial, sustentada no papel central da disfunção cognitiva à longo prazo.

7 CONCLUSÕES

Conclui-se então que comprometimento a longo prazo da função cerebral está temporariamente relacionado à disfunção mitocondrial. A melhora farmacológica da função mitocondrial por ativadores de autofagia mitocondrial poderia recuperar animais com comprometimento cognitivo e sugerir um potencial terapêutico, porém mais estudos serão necessários para elucidar seus mecanismos.

REFERÊNCIAS

- Abraham E, Singer M: Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med.* 2007; 35:2408–2416.
- Abraham, E. New Definitions for Sepsis and Septic Shock. *JAMA.* 2016;315(8), 757. doi:10.1001/jama.2016.0290
- Andrades M, Ritter C, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *J Surg Res.* 2005;125(1):68-72.
- Andrades M, Ritter C, Dal-Pizzol F. The role of free radicals in sepsis development. *Front Biosci.* 2009;1:277–87.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; 29:1303–10.
- Angus DC, Carlet J. Surviving intensive care: a report from the 2002 Brussels Roundtable. *Intensive Care Med.* 2003;29(3):368–77.
- Angus DC, Van Der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013; 369:840–51.
- Annane, D., Sharshar, T. Cognitive decline after sepsis. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2015;3(1), 61–69. doi:10.1016/s2213-2600(14)70246-2.
- Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Long-term cognitive impairment in sepsis survivors. *Crit Care Med.* 2005; 33(7):1671.
- Barichello T, Martins MR, Relinked A, Constantino LS, Valvassori SS, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40:831-837.
- Barichello T, Sayana P, Giridharan VV, Arumanayagam AS, Narendran B, Della Giustina A, Petronilho F, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Long-term cognitive outcomes after sepsis: a translational systematic review. *Mol. Neurobiol.* 2018; 56(1):186-251.
- Bingol B, Sheng M: Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond. *Free Radic Biol Med* 2016; 16:30033-8.
- Boveris A, Alvarez S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(9):1186-1193.
- Bozza FA, D’Avila JC, Ritter C, Sonnevile R, Sharshar T, Dal-Pizzol F. Bioenergetics, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Septic Encephalopathy. *Shock.* 2013;39(7):10–6.

Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002; 360:219-223.

Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286:491-R497.

Bricca G; Dontenwill M; Molines A; Feldman J; Tibiriçá E; Belcourt A; Bousquet P. Rilmenidine selectivity for imidazoline receptors in human brain. *European Journal of Pharmacology*, 1989; 163: 373-377.

Burté F, Carelli V, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*. 2014;11(1):11–24.

Campello S, Strappazon F, Cecconi F. Mitochondrial dismissal in mammals, from protein degradation to mitophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1837(4):451–60.

Carchman EH, Whelan S, Loughran P, Mollen K, Stratamirovic S, Shiva S, Rosengart MR, Zuckerbraun BS. Experimental sepsis-induced mitochondrial biogenesis is dependent on autophagy, TLR4, and TLR9 signaling in liver. *Faseb J*. 2013;27(12):4703-4711.

Cassina A; Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch of Biochem and Biophys*. 1986; 328: 309-316

Carre JE, Singer M. Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1777(7-8):763-771.

Carre JE, Orban J-C, Re L et al: Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 745–751.

Cinel L, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis*. 2007 ;20(4):345-52.

Cieri D, Brini Mand Cali T: Emerging (and converging) pathways in Parkinson's disease: keeping mitochondrial wellness. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 483:1020-1030.

Chisholm KI, Ida KK, Davies AL, Tachtsidis I, Papkovsky DB, Dyson A, Singer M, Duchon MR, Smith KJ. Hypothermia protects brain mitochondrial function from hypoxemia in a murine model of sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015; 36(11):1955-1964.

Cherry AD, Piantadosi CA. Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Its Intersection with Inflammatory Responses. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015; Vol.22.:12.

Chuang YC, Lin TK, Huang HY, Chang WN, Liou CW, Chen SD. Peroxisome proliferator-activated receptors γ /mitochondrial uncoupling protein 2 signaling protects against seizure-induced neuronal cell death in the hippocampus following experimental status epilepticus. *J Neuroinflam*. 2012;9:2-18.

Cassol OJ, Rezin GT, Petronilho FC, Scaini G, Gonçalves CL, Ferreira GK, et al. Effects of N-acetylcysteine/deferroxamine, taurine and RC-3095 on respiratory chain complexes and creatine kinase activities in rat brain after sepsis. *Neurochem Res.* 2010;35(4):515–21.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, Scaini G, Daufenbach JF, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res.* 2011;36(2):304-311.

Comim CM, Rezin GT, Scaini G, Di-Pietro PB, Cardoso MR, Petronilho FC, Ritter C, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion.* 2008;8(4):313-318.

Côté HC, Day AG, Heyland DK. Longitudinal increases in mitochondrial DNA levels in blood cells are associated with survival in critically ill patients. *Crit Care.* 2007;11(4):88.

Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion.* 2004;4(5-6):729–41.

Crouser E, Exline M, Knoell D, Wewers MD. Sepsis: Links between Pathogen Sensing and Organ Damage. *Curr Pharm Des.* 2008;14(19):1840-1852.

Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol-Jr OJ, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Oxidative Mechanisms of Brain Dysfunction During Sepsis. *Neurochem Res.* 2010;35(1):1-12.

Dal-Pizzol F, Tomasi CD, Ritter C. Septic encephalopathy: Does inflammation drive the brain crazy? *Rev Bras Psiquiatr.* 2014;36(3):251–8.

Daum G. Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1995;822:1-42.

Daum G, Horvath S.E. Lipids of mitochondria. *Progress in Lipid Research*, Volume 52, Issue 4, 2013, pp. 590-614.

D’Avila JCP, Santiago APSA, Amâncio RT, Galina A, Oliveira MF, Bozza FA. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med.* 2008;36(6):1925–32.

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock 2013;41(2):580–637.

De Menezes C, Dorneles A, Sperotto R, Duarte M, Schetinger M, Loro V. Oxidative Stress in Cerebrospinal Fluid of Patients with Aseptic and Bacterial Meningitis. *Neurochem Res.* 2009;34(7):1255–60.

Exline MC, Crouser ED. Mitochondrial Mechanisms of Sepsis-Induced Organ Failure. *Front Biosci.* 2014; 13:5030-5041.

Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1367-73.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB.* 1997; 43(1):61-8.

Fin M. Heard SOL Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990; 49:186-196.

Fink MP. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit Care.* 2002;6(6):491-499.

Fischer JC; Ruitenbeek W; Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 1985; 153:23-26.

Frake R, Ricketts T, Menzies MF, Rubinsztein DC. Autophagy and neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2015; 125:65-74.

Frost MT, Wang Q, Moncada S, Singer M. Hypoxia accelerates nitric oxide-dependent inhibition of mitochondrial complex I in activated macrophages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(2):394-400.

Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* 2011;107(1):57-64.

Goldenthal MJ, Marín-García J. Mitochondrial signaling pathways: A receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem.* 2004;262(1-2):1-16.

Gutsaeva DR, Carraway MS, Suliman HB, Demchenko IT, Shitara H, Yonekawa H, Piantadosi CA. Transient Hypoxia Stimulates Mitochondrial Biogenesis in Brain Subcortex by a Neuronal Nitric Oxide Synthase-Dependent Mechanism. *J Neurosci.* 2008;28(9):2015-24.

Gunther ML, Morandi A, Krauskopf E, Pandharipande P, Girard TD, Jackson JC, Thompson J, Shintani AK, Geevarghese S, Miller RR 3rd, Canonico A, Merkle K, Cannistraci CJ, Rogers BP, Gatenby JC, Heckers S, Gore JC, Hopkins RO, Ely EW; VISIONS Investigation, VISualizing Icu SurvivOrs Neuroradiological Sequelae. The association between brain volumes, delirium duration, and cognitive outcomes in intensive care unit survivors: the VISIONS cohort magnetic resonance imaging study*. *Crit Care Med.* 2012;40(7):2022-32.

Gunst J: Recovery from critical illness-induced organ failure: the role of autophagy. *Crit Care*; 2017;21(1):209.

Gunst J, Decrese I, Aertgeerts A, I Ververs EJ, Wauters A, Van den Berghe G, Vanhorebeek I. Insufficient autophagy contributes to mitochondrial dysfunction, organ failure, and adverse outcome in an animal model of critical illness. *Crit Care Med.* 2013; 41:182-194.

Griffith DM, Lewis S, Rossi AG, Rennie J, Salisbury L, Merriweather JL, Templeton K, Walsh TS; Systemic inflammation after critical illness: relationship with physical recovery and exploration of potential mechanisms. *Thorax*.2016; 71:820-829.

Zhang H, Feng Y, Yao Y Potential therapy strategy: targeting mitochondrial dysfunction in sepsis *Mil Med Res*. 2018; 5:41.

Haden DW, Suliman HB, Carraway MS, Welty-Wolf KE, Ali AS, Shitara H, Yonekawa H, Piantadosi CA. Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:768–777.

Harris RA, Harris DL, and Green DE. Effect of *Bordetella* endotoxin upon mitochondrial respiration and energized processes. *Arch Biochem Biophys* 1968; 128: 219–230.

Harris H, Rubinsztein DC. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2012; 8:108-117.

Hill NE, Saeed S, Phadke R. Detailed characterization of a long-term rodent model of critical illness and recovery. *Crit Care Med* 2015; 43:84-96.

Hill SM, Wrobel L, Rubinsztein DC Correction to: Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation *Cell Death Differ*. 2019 41418-019-0346-1.

Ho J, Yu J, Sunny H, Zhang L, Liu X, Wong WT, Leung GC, Wang MHT, Chan MTV, Wu WKK. Autophagy in sepsis: Degradation into exhaustion? *Cells* 2019, 8(1), 18; <https://doi.org/10.3390/cells8010018>.

Hui Zhang, Yong-wen Feng, Yong-ming Yao Potential therapy strategy: targeting mitochondrial dysfunction in sepsis *Mil Med Res*. 2018; 5:41

Hüttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G, Varughese A, Lu G, Liu J, Ramzan R, Vogt S, Grossman LI, Doan JW, Marcus K, Lee I. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2012;141(4):520–9.

Iwashyna T, Ely EW, Smith DM, Langa KM Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *Jama*. 2010;304(16):1787–94.

Johri A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 342:619–630.

Kanamaru Y, Sekine S, Ichijo H et al. The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. *J Signal Transduct*. 2012:ID931215.

- Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA*. 2014;311(13):1308–16.
- Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R: Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci* 2008;13: 1813-1826.
- Kim YK; Park JY; Hwang JH. Comparison of antiallodynic effect of intrathecal morphine, brominidine and rilmenidine between neuritis and ligation injury induced neuropathic pain. *Korean Journal of Anesthesiology*, 2009; 56(4): 425:432.
- Khader A, Yang WL, Godwin A, Prince JM, Nicastro JM, Coppa GF, Wang P. Sirtuin 1 Stimulation Attenuates Ischemic Liver Injury and Enhances Mitochondrial Recovery and Autophagy. *Crit. Care Med.*2016; 44:651-663.
- Kim YC, Guan KL: mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 2015; 125:25–32.
- Kowaltowski Aj, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 2001; 495:12-5.
- Landreth G, Jiang G, Mandrekar S, Heneka M. PPARgamma agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 2008; 5:481-489.
- Levy RJ, Piel PD Evidence of myocardial hibernation in the septic heart. *Crit Care Med* 2005; 33:2752-2756.
- Lee E, Glover CM, Rosario-ortiz FL. Photochemical Formation of Hydroxyl Radical from Effluent Organic Matter: Role of Composition. *Environ Sci Technol.* 2013;47(21):12073–80.
- Lee I, Hüttemann M. Energy crisis: The role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(9):1579-86.
- Levi, M, van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med.* 2010;38(2):85–91.
- Levy RJ, Vijayasarathy C, Raj NR, Avadhani NG, and Deutschman CS. Competitive and noncompetitive inhibition of myocardial cytochrome C oxidase in sepsis. *Shock* 2014; 21: 110–114,
- Levy, RJ, Deutschman CS. Deficient mitochondrial biogenesis in critical illness: cause, effect, or epiphenomenon? *Crit Care.* 2007;11(4):158.
- Li YW; Dampney RAL. Clonidine and rilmenidine suppress hypotension induced for expression in the lower brainstem of the conscious rabbit. *Neuroscience*, 1995; 66 (2): 391-402.
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 2002;80:780-7.

Marín-García J, Goldenthal M. Mitochondria play a critical role in cardioprotection: J. Cardiac Failure. 2004; 1: 55-66.

Mathiasen JR, DiCamillo A: Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function. *Curr Protoc Pharmacol* 2010; 5: 5-59.

Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2014;5(19):4–11.

McCreath G, Scullion MMF, Lowes DA, Webster NR, Galley. Pharmacological activation of endogenous protective pathways against oxidative stress under conditions of sepsis. *Br J Anaesth*. 2016;116(1):131-139.

McLeod CJ, Jeyabalan AP, Minners JO, Clevenger R, Hoyt RF Jr, Sack MN. Delayed ischemic preconditioning activates nuclear-encoded electron-transfer-chain gene expression in parallel with enhanced postanoxic mitochondrial respiratory recovery. *Circulation*. 2004;110(5):534–9.

Melov S, Coskun PE, Wallace DC. Mouse models of mitochondrial disease, oxidative stress, and senescence. *Mutat Res*. 1999;434(3):233-42.

Mendelev N, Mehta SL, Witherspoon S, He Q, Sexton JZ, Li PA. Upregulation of human selenoprotein H in murine hippocampal neuronal cells promotes mitochondrial biogenesis and functional performance. *Mitochondrion*. 2011;11(1):76–82.

Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(10):634–46.

Montgomery, M. K., Turner, N., Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine connections* 2015, 4, R1-R15.

Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2011;12(3):222-230.

Narendra D, Tanakan A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008; 183:795–803.

Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C670-C686.

Navarrete ML, Cerdeño MC, Serra MC, Conejero R. Mitochondrial and microcirculatory distress syndrome in the critical patient. Therapeutic implications. *Med Intensiva*. 2013;37(7):476–84.

Nogueira V, Rigoulet M, Piquet MA, Devin A, Fontaine E, Leverve XM. Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *J Biol Chem* 2001; 276: 46104–46110.

Owen HC, Vanhees I, Gunst J, Van Cromphaut S, Van den Berghe G. Critical illness-induced bone loss is related to deficient autophagy and histone hypomethylation. *Intensive Care Med* 2015; 3:52.

Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature* 2015; 521:525–528.

Pandharipande PP, Girard TD, Ely EW. Long-term cognitive impairment after critical illness.

Patil NK, Parajuli N, MacMillan-Crow LA, Mayeux PR. Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis: mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(7):734-43.

Perez-Pinzon MA, Stetler RA. Novel mitochondrial targets for neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32:1362.

Petronilho F, Florentino D, Danielski LG, Vieira LC, Martins MM, Vieira A, Bonfante S, Goldim MP, Vuolo F. Alpha-Lipoic Acid Attenuates Oxidative Damage in Organs After Sepsis. *Inflammation*. 2016;39(1):357–65.

Prescott HC, Angus DC: Enhancing recovery from sepsis: a review. *JAMA* 2018; 319: 62-75.
Quirós PM, Langer T, López-Otín C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(6):345–59.

Reid JL. Rilmenidine: A clinical overview. *The American Journal of Hypertension*, 2000; 13 (6): 106-111.

Ritter C, Andrades M, Frota MLC, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, Klamt F, Pinheiro CT, Menna-Barreto SS, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med*. 2003;29(10):1782–9.

Ritter C, Miranda AS, Giombelli VR, Tomasi CD, Comim CM, Teixeira AL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels are associated with mortality in critically ill patients even in the absence of brain injury. *Crit Care*. 2012; 16(6):R234.

Rocheteau P, Chatre L, Briand D, Mebarki M, Jouvion G, Bardon J, Crochemore C, Serrani P, Lecci PP, Latil M, Matot B, Carlier PG, Latronico N, Huchet C, Lafoux A, Sharshar T, Ricchetti M, Chrétien F. Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy. *Nat Commun*. 2015; 6:10145.

Rodriguez-Rivera J, Denner L, Dineley K. Rosiglitazone Reversal of Tg2576 Cognitive Deficits is Independent of Peripheral Gluco-Regulatory Status. *Behav Brain Res*. 2011; 216(1):255-261.

Romanello V, Sandri M. Mitochondrial Quality Control and Muscle Mass Maintenance. *Front Physiol*. 2016;(6):1–21.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chimica Acta*. 1994; 228:35-51.

Sabetkasaie M; Khansefid N; Ladgevardi, ARS. Possible role of NMDA receptors in antinociception induced by rilmenidine in mice in the formalin test. *European Journal of Pain*, 2007; 11: 535-541.

Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI. Systemic Inflammation and the Brain: Novel Roles of Genetic, Molecular, and Environmental Cues as Drivers of Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(Feb):1–2.

Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, Mormann F, Weide J, Fliessbach K, Hoefl A, Jessen F, Putensen C, Heneka MT. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84:62-69.

Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 2012; 26;48(2):158-67. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.025

Schmidt K, Worrack S, Von Korff M, Davydow D, Brunkhorst F, Ehlert U, Pausch C, Mehlhorn J, Schneider N, Scherag A, Freytag A, Reinhart K, Wensing M, Gensichen J; Effect of a primary care management intervention on mental health-related quality of life among survivors of sepsis: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2016; 315:2703-2711.

Schwalm MT, Pasquali M, Miguel SP, Dos Santos JP, Vuolo F, Comim CM, Petronilho F, Quevedo J, Gelain DP, Moreira JC, Ritter C, Dal-Pizzol F. Acute brain inflammation and oxidative damage are related to long-term cognitive deficits and markers of neurodegeneration in sepsis-survivor rats. *Mol Neurobiol*. 2013;49(1):380–5.

Schumer W, Erve P, Kapica SK, and Moss GS. Endotoxin effect on respiration of rat liver mitochondria. *J Surg Res* 1970.10: 609–612.

Shon E, Bonilla E, DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr*. 1995; 29:131-49.

Siami S, Annane D, Sharshar T. The Encephalopathy in Sepsis. *Crit Care Clin*. 2008;24(1):67–82.

Singer M. Mitochondrial function in sepsis: Acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med*. 2008;35(9 Suppl):S441-448.

Singer M: Cellular dysfunction in sepsis. *Clin Chest Med* 2008; 29:655–660

Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*. 2014;5(1):66-72.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin

GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Clin Rev e Educ.* 2016;315(8):801–10.

Sonneville R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, Chretien F, Sharshar T. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Annals of Intensive Care*; 2013;3(1):15.

Streck EL, Comim CM, Barichello T, Quevedo J. The septic brain. *Neurochem Res.* 2008;33(11):2171–7.

Srere PA (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol*; 13:3–11.

Stallons LJ, Funk JA, Schnellmann RG. Mitochondrial Homeostasis in Acute Organ Failure. *Curr Pathobiol Rep.* 2013;72(2):181–204.

Stanger O, Wonisch W. Enzymatic and Non-enzymatic Antioxidative Effects of Folic Acid and Its Reduced Derivates. In: *Water Soluble Vitamins.* 56th ed. New York: Springer; 2012. p. 131–61.

Steenbergen S, Rijkenberg S, Adonis T, Kroeze G, van Stijn I, Endeman H. Long-term treated intensive care patients outcomes: the one-year mortality rate, quality of life, health care use and long-term complications as reported by general practitioners. *BMC Anesthesiol.* 2015;15(1):142.

Stetler RA, Leak RK, Gao Y, Chen J. The dynamics of the mitochondrial organelle as a potential therapeutic target. *J Cereb Blood Flow Metab.* Nature Publishing Group; 2012;33(1):22–32.

Stevens SL, Leung PY, Vartanian KB, et al. Multiple preconditioning paradigms converge on interferon regulatory factor-dependent signaling to promote tolerance to ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2011;31(23):8456–63.

Su Y, Qu Y, Zhao F, Li H, Mu D, Li X. Regulation of autophagy by the nuclear factor κ B signaling pathway in the hippocampus of rats with sepsis. *J Neuroinflamm.* 2015; 12: 116.

Suliman HB, Carraway MS, Welty-Wolf KE, Whorton AR, Piantadosi CA. Lipopolysaccharide Stimulates Mitochondrial Biogenesis via Activation of Nuclear Respiratory Factor-1. *J Biol Chem.* 2003;278(42):41510–8.

Suliman H, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide Oxidative Damage of Mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(4):570-579.

Suliman HB, Welty-Wolf KE, Carraway M, Welty-Wolf KE, Whorton AR, Piantadosi CA. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. *Cardiovasc Res.* 2004;64(2):279–88.

Suliman HB, Welty-Wolf KE, Carraway MS, Schwartz DA, Hollingsworth JW, Piantadosi CA. Toll-like receptor 4 mediates mitochondrial DNA damage and biogenic responses after heat-inactivated *E. coli*. *FASEB J.* 2005;19(11):1531–3.

- Suliman HB, Sweeney TE, Withers CM, Piantadosi CA. Co-regulation of nuclear respiratory factor-1 by NFkB and CREB links LPS-induced inflammation to mitochondrial biogenesis. *Journal of Cell Science*. 2010;123:2565-2575.
- Suliman HB, Piantadosi CA. Mitochondrial quality control as a therapeutic target. *Pharmacol Rev*. 2016;68(1):20-48.
- Taniguchi LU, Bierrenbach AL, Toscano CM, Schettino GP, Azevedo LC. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis
- Terman A, Kurz T, Navratil M, Arriaga EA, Brunk UT. Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells. The mitochondrial–lysosomal axis theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12:503–553.
- Tran MT, Zsengeller ZK, Berg AH, Khankin EV, Bhasin MK, Kim W, Clish CB, Stillman IE, Karumanchi SA, Rhee EP, Parikh SM. PGC1 α drives NAD biosynthesis linking oxidative metabolism to renal protection. *Nature* 2016; 24:528-532.
- Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and LPS activation cluster *Trends Immunol*. 2002;23(6):301-4.
- Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med*. 2008; 34:1724-1731.
- Twig G, Shirihai OS. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(10):1939–51.
- Vanhorebeek I, Gunst J, Derde S, Derese I, Boussemaere M, Güiza F, Martinet W, Timmermans JP, D'Hoore A, Wouters PJ, Van den Berghe G. Insufficient activation of autophagy allows cellular damage to accumulate in critically ill patients. *J Clin Endocrinol Meta* 2011;96:633, 645.
- Van der Poll T, Opal SM. Host–pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*. 2008;(8): 32–43.
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 1999; 238, p.211-230.
- Walsh TS, Salisbury LG, Merriweather JL, Boyd JA, Griffith DM, Huby G, Kean S. Increased hospital-based physical rehabilitation and information provision after intensive care unit discharge: the RECOVER randomized clinical trial. *JAMA Intern Med* 2015; 175:901-910.
- Walsh CJ, Batt J, Herridge MS, Mathur S, Bader GD, Hu P, Dos Santos CC. Transcriptomic analysis reveals abnormal muscle repair and remodeling in survivors of critical illness with sustained weakness. *Sci Rep* 2016; 6:29334.

West AP, Shadel GS, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nature Rev. Immunology*. 2011; 11(6), 389.

Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group. 2010;11(12):872–84.

Widmann CN, Heneka MT. Long-term cerebral consequences of sepsis. *Lancet Neurol*. 2014;13(6):630–6.

White AT, Murphy AN: Administration of thiazolidinediones for neuroprotection in ischemic stroke: a pre-clinical systematic review. *J Neurochem* 2010; 115:845-853.

Wu X, Fleming A, Ricketts T, Pavel M, Virgin H, Menzies FM, Rubinsztein DC Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and *Nature Commun* 2016; 7:10533.

Yen YT, Yang HR, Lo HC, Hsieh YC, Tsai SC, Hong CW, Hsieh CH. Enhancing autophagy with activated protein C and rapamycin protects against sepsis-induced acute lung injury. *Surgery* 2014; 153:689-698.

Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating Mitochondrial DAMPs Cause Inflammatory Responses to Injury. *Nature*. 2010;464(7285):104–7.

Zhang H, Feng Y, Yao Y Potential therapy strategy: targeting mitochondrial dysfunction in sepsis *Mil Med Res*. 2018; 5:41.

Zhou J, Qian C, Zhao M et al. Epidemiology and outcome of severe sepsis and septic shock in intensive care units in Mainland China. *PLoS One*. 2014;9(9):1–8. time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 1999; 6: 600–607.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aceite do Comitê de Ética referente ao Protocolo I



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da Dinâmica Mitochondrial na Recuperação da Função Neurológica e Disfunção Cognitiva em Animais Sobreviventes a Sepsis**", registrada com o protocolo nº **012/2016-2**, sob a responsabilidade de **Felipe Dal-Pizzol**, junto à equipe: Pricila Romão Marcondes Ávila, Monique Michels, Beatriz Sonai - 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 **23/08/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/09/2016 a 31/11/2016
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	450
Peso/Idade	200- 300 g / 60 dias
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: "**Evaluation of Mitochondrial Dynamics in the Recovery of Neurological Function and Cognitive Dysfunction in Survivors Sepsis Animals**".

Protocol number: **012/2016-2**

Principal Investigator: **Felipe Dal-Pizzol**

Researchers: **Pricila Romão Marcondes Ávila, Monique Michels, Beatriz Sonai.**

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 or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 23 de agosto de 2016.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA

ANEXO B – Carta de aceite do Comitê de Ética referente ao Protocolo II



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



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, 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/UNESC, em reunião de **16/05/2017**.

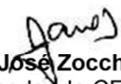
Título do projeto	Administração de rapamicina, rilmenidina e rosiglitazona e seus efeitos no autofagossoma e no ciclo vicioso mediado por mitocôndrias em ratos Wistar submetidos a sepse.
Project title	Administration of rapamycin, rilmenidine and rosiglitazone and their effects on the autophagosome and the vicious cycle mediated by mitochondria in Wistar rats submitted to sepsis.
Número do protocolo Protocol number	060/2017-1
Pesquisador principal Principal Investigator	Felipe Dal Pizzol
Pesquisadores Researchers	Diogo Dominguni; Amanda Valnier Steckert; Renata Casagrande Gonçalves; Tatiana Barichello; João Luciano de Quevedo

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2017 a 01/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	184
Idade/Peso	60 / 250-350g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that 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/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 16 de maio de 2017.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA

ANEXO C – Representação dos *Western Blotting* das proteínas da via da autofagia/mitofagia



Representação dos *Western Blotting* da quantificação das principais proteínas envolvidas da via da autofagia e mitofagia seus respectivos *blotts*, onde foram comparados e normalizados com a proteína padrão B-actina representada em cada uma das proteínas pela segunda banda. Os dados foram expressos em ug/proteína de homogenato de tecido.