

**LUIZ FELIPE SOUZA E SILVA**

**PAPEL DAS SIRTUÍNAS SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E A  
NEUROGÊNESE EM DIFERENTES MODELOS CELULARES DE HIPÓXIA:  
RELEVÂNCIA PARA A GÊNESE E PROGRESSÃO DA ESQUIZOFRENIA**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

São Paulo  
2022

**LUIZ FELIPE SOUZA E SILVA**

**PAPEL DAS SIRTUÍNAS SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E A  
NEUROGÊNESE EM DIFERENTES MODELOS CELULARES DE HIPÓXIA:  
RELEVÂNCIA PARA A GÊNESE E PROGRESSÃO DA ESQUIZOFRENIA**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Area de concentração: Farmacologia

Orientador(a): Tatiana Rosado Rosenstock

São Paulo  
2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Souza e Silva, Luiz Felipe  
PAPEL DAS SIRTUÍNAS SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL  
E A NEUROGÊNESE EM DIFERENTES MODELOS CELULARES DE  
HIPÓXIA: RELEVÂNCIA PARA A GÊNESE E PROGRESSÃO DA  
ESQUIZOFRENIA / Luiz Felipe Souza e Silva;  
orientadora Tatiana Rosado Rosenstock. -- São  
Paulo, 2022.  
221 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Mitocôndrias. 2. Hipóxia. 3. Esquizofrenia. 4.  
Modulação epigenética. 5. Sirtuínas. I. Rosado  
Rosenstock, Tatiana, orientador. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

---

Candidato(a): **Luiz Felipe Souza e Silva**

Título da Dissertação/Tese: Papel das sirtuínas sobre a função mitocondrial e a neurogênese em diferentes modelos celulares de hipóxia: relevância para a gênese e progressão da esquizofrenia

Orientador: **Tatiana Rosado Rosenstock**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

**Aprovado(a)**                       **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PAPEL DAS SIRTUÍNAS SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E A NEUROGÊNESE EM DIFERENTES MODELOS CELULARES DE HIPÓXIA: RELEVÂNCIA PARA GÊNESE E PROGRESSÃO DA ESQUIZOFRENIA", protocolada sob o CEUA nº 7646061120, sob a responsabilidade de **Cristoforo Scavone e equipe; Luiz Felipe Souza E Silva; Tatiana Rosenstock** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 17/12/2020.

We certify that the proposal "The role of sirtuins on mitochondrial function and neurogenesis in different models of cellular hypoxia: relevance to the genesis and progression of Schizophrenia.", utilizing 170 Heterogenics rats (50 males and 120 females), 170 Isogenic rats (50 males and 120 females), protocol number CEUA 7646061120, under the responsibility of **Cristoforo Scavone and team; Luiz Felipe Souza E Silva; Tatiana Rosenstock** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 12/17/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Farmacologia**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**  
Espécie: **Ratos heterogênicos** sexo: **Fêmeas** Idade ou peso: **3 a 8 meses**  
Linhagem: **Wistar** **N amostral: 120**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**  
Espécie: **Ratos heterogênicos** sexo: **Machos** Idade ou peso: **3 a 8 meses**  
Linhagem: **Wistar** **N amostral: 50**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**  
Espécie: **Ratos isogênicos** sexo: **Machos** Idade ou peso: **3 a 8 meses**  
Linhagem: **SHR** **N amostral: 50**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**  
Espécie: **Ratos isogênicos** sexo: **Fêmeas** Idade ou peso: **3 a 8 meses**  
Linhagem: **SHR** **N amostral: 120**

São Paulo, 06 de janeiro de 2021



Universidade de São Paulo  
**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

*Luciane Valéria Sita*

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PEDIDO DE ALTERAÇÃO (ID 94161) À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: 003.830.288-84

Título da proposta: PAPEL DAS SIRTUINAS SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E A NEUROGÊNESE EM DIFERENTES MODELOS CELULARES DE HIPÓXIA: RELEVÂNCIA PARA GÊNESE E PROGRESSÃO DA ESQUIZOFRENIA

Pesquisador: Cristoforo Scavone

Equipe: Luiz Felipe Souza e Silva, Tatiana Rosenstock

Telefone: 3091-7233


e-mail: cscavone@icb.usp.br

Resumo: **RESUMO:** neurodesenvolvimento, bem como as etapas que o compõe, como proliferação, diferenciação e migração neuronal, formação de sinapses, mielinização e poda sináptica, são dependentes de adenosina trifosfato (ATP), do tamponamento de cálcio intracelular e/ou da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Portanto, todas as vias essenciais para o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) são dependentes do funcionamento mitocondrial. Sabe-se hoje, que alterações em qualquer uma destas etapas pode resultar em transtornos psiquiátricos, como a Esquizofrenia (SZ). Alterações decorrentes de fatores ambientais nas fases essenciais para o desenvolvimento do SNC, como a redução de oxigênio (hipóxia), podem resultar em variações na circuitaria neuronal e, consequentemente, a déficits comportamentais relacionados a transtornos psiquiátricos. De fato, diversos estudos relacionam a hipóxia à pré-eclâmpsia, hipertensão na gravidez, e ao surgimento da SZ (Tong et al., 2019; Matsubara, 2018). No projeto atual (já aprovado pelo CEUA), utilizamos os ratos espontaneamente hipertensos, do inglês Spontaneous Hypertensive Rats (SHR), pelo fato deles mimetizarem uma situação de hipóxia durante a gravidez (Silva et al., 2019). Ainda, esses animais têm sido amplamente utilizados como modelos de SZ, o que integra o escopo do projeto (Nigaki et al., 2019; Peres et al., 2018). O projeto desenvolvido pelo aluno visa entender como a hipóxia altera a função mitocondrial, in vitro, utilizando células primárias neuronais e astrocitárias desses animais. Além da avaliação da hipóxia, o projeto conta com a modulação epigenética para restaurar as funções mitocondriais prejudicadas através do tratamento com moduladores de sirtuínas como a Nicotinamida (NAM). O NAM em nossos estudos in vitro tem se mostrado eficaz em restaurar os níveis de NAD+, outrora diminuídos nas células oriundas de animais SHR, bem como restaurar funções mitocondriais importantes que estavam prejudicadas, como potencial de membrana mitocondrial e homeostase de cálcio, além de estabilizar os níveis de EROS. Além disso, o NAM parece modular positivamente vias de biogênese mitocondrial aumentando a expressão de genes como Pgc1?, Tfam, Nrf1, mtCO1 e Nfele2, e os níveis de Tom20 (Silva et al, 2021 in preparation). Apesar dos estudos in vitro nos darem a resposta de como as células agem na presença de um estímulo (hipóxia e NAM), eles não representam de forma completa o sistema alvo do estudo, o cérebro. Nesse sentido, solicitamos esse adendo para que possamos avaliar o uso de NMN, ou Nicotinamide mononucleotide, diretamente sobre os animais (organismo completo). Com isso, pretendemos não apenas realizar estudos in vivo (testes comportamentais) com os animais SHR, como também poderemos extrair o cérebro desses animais para avaliar ex vivo a função mitocondrial. Desta forma, poderemos esmiuçar a participação da disfunção mitocondrial oriunda da hipóxia com os comportamentos esquizoideis apresentados pelos animais SHR, além de propor um tratamento à base de um suplemento alimentar amplamente utilizado. O NMN é um suplemento alimentar que tem se mostrado eficaz no boost energético e na melhora da função mitocondrial. Nas células de mamíferos o NAD+ é produzido predominantemente pela conversão de NMN para NAD+ pela enzima Nicotinamide mononucleotide adenylyl transferases (NMNAPT). O NAD+ é um metabólito vital necessário para mais de 500 reações enzimáticas, e a sua diminuição tem sido relacionado com uma gama de desordens psiquiátricas, incluindo a SZ. Vale dizer que perante uma situação de hipóxia, há uma diminuição dos níveis de NAD+ (Silva et al., 2019; Shetty et al., 2014) Na luz de diversos suplementos no mercado, conseguimos uma parceria com um fornecedor internacional de NMN, a NMN bio® coordenado pela Dr. Elena Seranova e com sede na Inglaterra. O NMN possui qualidade de 99,8% e a empresa nos concedeu quantidades suficientes para o tratamento dos animais para este estudo, caso o adendo seja aprovado. Relevância: Como citado, nossos trabalhos tem demonstrado que a administração de NAM in vitro é capaz de reverter diversas disfunções mitocondriais, como recuperar a despolarização da mitocôndria, estabilização dos níveis de Ca2+ e de EROS, bem como, aumentar a expressão de genes envolvidos com a biogênese mitocondrial, como Pgc1?, Tfam, Nrf1, mtCO1 e Nfele2, e os níveis de Tom20 (Silva et al, 2021 in preparation). Por isso, na presente proposta, pretendemos investigar, in vivo, se o composto NMN (substrato direto para produção de NAD+) é capaz de melhorar a função mitocondrial, bem como reverter o comportamento do tipo esquizofrênico dos animais SHR. Acreditamos que com esse projeto será possível compreender o real papel da disfunção mitocondrial para o neurodesenvolvimento e, ainda, a importância do correto metabolismo energético para comportamento que pode ser prejudicado com prejuízo nesse processo. Com isso, haverá a possibilidade de se estabelecer alvos para uma possível estratégia terapêutica contra desordens psiquiátricas, como a SZ. JUSTIFICATIVA: A utilização de 24 machos Wistars e de 24 SHR se deve ao fato de necessitarmos de animais para obtenção de dados comportamentais relevantes (n=12 por grupo, no total de 4 grupos; ver arquivo em anexo). Lembrando que será desses mesmos animais que obteremos os cérebros para a análise da função mitocondrial ex vivo, e para a realização de extração de proteínas e de mRNA. O tratamento com NMN será realizado via gavagem, uma vez que os suplementos alimentares a base desse composto são utilizados por via oral. Desta maneira, poderemos estabelecer uma correlação entre os achados e a via de administração. O tratamento será realizado por 30 dias, 1 vez ao dia, na concentração de 250mg/kg (concentração previamente estabelecida em estudos anteriores) (Naia et al., 2017). Os animais solicitados terão 2 meses e o início do tratamento será no 3º mês, dando um mês para a adequação do animal no biotério novo. Os testes comportamentais serão realizados com animais de 4 meses de vida. Dentre os testes, iremos realizar: 1) interação social □ para a verificação do comportamento social, 2) tarefa de medo condicionado ao contexto, para verificação da memória aversiva, e3) Preferência Social, para verificar se o animal prefere interagir com um estímulo social ou um estímulo não social (objeto). Justificativa do uso dos procedimentos e da espécie: Ratos Wistar são animais amplamente utilizados para experimentação e possuem todos seus hábitos, comportamentos e boa parte do genoma conhecidos, tornando assim mais fácil realizar comparações e correlações entre os achados comportamentais e moleculares. Já os animais SHR, são amplamente utilizados como modelos de hipóxia intrauterina e SZ, também tendo seu genoma conhecido, bem como hábitos e comportamentos.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema ("<http://ceua.icb.usp.br>") por meio da sua senha de acesso.



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Instituto  
de Ciências  
Biomédicas

*Excelência em Ensino e Pesquisa*



**Dedico esse trabalho a todos os cientistas brasileiros(as) que perseveraram na ciência e no desenvolvimento científico durante o momento mais complicado da história do Brasil. Para que todos confiem no seu talento e nunca desistam dos seus sonhos. Ciência é para todos. Aos meus colegas, amigos e aos meus pais, que serviram de alicerces para que esse projeto fosse realizado. Esse trabalho é pra todos nós.**

***Ubi Dubium Ibi Libertas***

## **AGRADECIMENTOS**

Ao laboratório de Neurofarmacologia Molecular, do Professor Cristoforo Scavone, e ao laboratório de Neurobiologia Molecular e Funcional, da Professora Elisa Mitiko Kawamoto Iwashe, que abriu as portas para que esse trabalho fosse realizado e pelo inestimável auxílio das técnicas de laboratório, Larissa e Diana.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo, por todo apoio e infraestrutura que foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Biotério de Produção de Ratos, Zuleica Bruno Fortes, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, em especial a Dra. Renaide Rodrigues Ferreira Gacek e a Dra. Lilian Tsujiguchi. Estendo esse agradecimento a todos os animais que utilizei no projeto, por suas vidas e pelo conhecimento adquirido por elas.

Agradeço aos colegas que compõem o time de cientistas do ICB I, pelos ensinamentos, críticas e sugestões, que fortaleceram diversos aspectos da minha carreira acadêmica.

Aos cientistas que compõem todo o time do Laboratório de Neurofarmacologia Molecular, vocês são incríveis.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Rosado Rosenstock, por sempre me dar forças para continuar a desenvolver ciência. Obrigado, de coração, por tudo aquilo que você me ensinou e ensina até hoje. Estendo esse agradecimento a Amanda Siena, companheira de longa data na jornada acadêmica, que sempre esteve a postos para auxiliar e ajudar, quando fosse necessário.

Aos meus pais, que sempre deram apoio pela carreira que escolhi, por mais complicada que fosse, eles sempre estavam lá, me dando apoio e liberdade para que eu continuasse. Ao meu irmão, que mesmo longe, me agraciou com conselhos e ajuda, nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus colegas, Lucas Muniz, André Telles, Lucas Bento e Fábio Peres, sempre juntos nessa jornada complicada da vida.

A Gabriela Oppermann, pela linda história que estamos escrevendo juntos, obrigado amor.

Aos colegas, amigos e pessoas que nem conheci, pelo apoio dado a Vakinha realizada, não consegui fazer aquilo que prometi, mas fiz aquilo que pude para melhorar a ciência brasileira, de coração, obrigado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro dado ao projeto nos anos de 2019 a 2020. Aos trancos, segue investindo em inovação, obrigado.

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro do projeto 2018/13814-0, nos anos de 2021 a 2022, obrigado por fomentar a ciência no Brasil.

Souza e Silva LF. Papel das sirtuínas sobre a função mitocondrial e a neurogênese em diferentes modelos celulares de hipóxia: relevância para a gênese e progressão da esquizofrenia [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2022

A hipóxia é um fator ambiental relacionado com complicações no neurodesenvolvimento devido à disfunção mitocondrial. Uma vez que as sirtuínas estão envolvidas na regulação do metabolismo mitocondrial e celular, investigamos se os moduladores das sirtuínas poderiam ser uma estratégia protetora contra a hipóxia. Para tal, utilizamos astrócitos e neurônios primários do córtex de animais Wistar (controle), e Ratos Hipertensos Espontâneos (modelo de hipóxia e esquizofrenia neonatal) expostos ao indutor de hipóxia química, o cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ). As células foram tratadas com  $\text{CoCl}_2$  800 $\mu\text{M}$  e 2 mM por 24 horas, e foram previamente e simultaneamente estimuladas com Nicotinamida (50  $\mu\text{M}$ ), Resveratrol (0,5  $\mu\text{M}$ ) e Sirtinol (5  $\mu\text{M}$ ) (num total de 48 horas). Foram analisados a capacidade de retenção de cálcio mitocondrial, o potencial de membrana mitocondrial e os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, investigamos a expressão de genes relacionados ao metabolismo, dinâmica e biogênese mitocondrial, bem como os níveis de compostos de alta energia. Vimos que a hipóxia química e neonatal induzem a despolarização mitocondrial, diminuição da capacidade de retenção de cálcio, e aumento dos níveis de ROS, da expressão do *Nfe2l2* e de genes relacionados a biogênese e fissão mitocondrial. A hipóxia também diminuiu os níveis de ATP e elevou os níveis de piruvato e lactato. A exposição prévia a todos os moduladores de sirtuínas aumentou a viabilidade dos astrócitos e neurônios, a expressão de *Nfe2l2* e reduziu a produção de ROS. Nos astrócitos, ainda houve um estímulo da biogênese mitocondrial, e nos neurônios, houve um aumento na produção de ATP, piruvato, lactato e da expressão de genes relacionados a fusão das mitocôndrias. Em conjunto, nossos resultados sugerem que os moduladores de sirtuínas podem ser usados como uma estratégia protetora contra a hipóxia, já que parecem contribuir para uma melhor compreensão de seus efeitos no sistema nervoso central e para o melhor entendimento da função mitocondrial e sua relação com distúrbios do neurodesenvolvimento.

Palavras-chave: mitocôndria, hipóxia, esquizofrenia e modulação epigenética

Souza e Silva L. F. Role of sirtuins on mitochondrial function and neurogenesis in different cellular models of hypoxia: relevance to the genesis and progression of schizophrenia [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2022.

Hypoxia is an environmental factor correlated with complications in neurodevelopment because of mitochondrial dysfunction. Once sirtuins are involved in the regulation of mitochondrial and cellular metabolism we investigated whether sirtuins modulators could be a neuroprotective strategy against hypoxia. We used primary cortical astrocytes and neurons from Wistar (control), and Spontaneous Hypertensive Rats (model of neonatal hypoxia and schizophrenia) exposed to the chemical hypoxia inducer, cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2$ ). The cells were treated with  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu\text{M}$  and 2 mM) for 24 hours and were previously and simultaneously stimulated with Nicotinamide (50  $\mu\text{M}$ ), Resveratrol (0.5  $\mu\text{M}$ ) and Sirtinol (5  $\mu\text{M}$ ) (48 hours). The mitochondrial calcium retention capacity, mitochondrial membrane potential and levels of reactive oxygen species were analyzed. In addition, genes related to mitochondrial metabolism, dynamics, and biogenesis, as well as levels of high-energy compounds were investigated. The chemical and neonatal hypoxia induced mitochondrial depolarization, decreased calcium retention capacity, and increased levels of ROS, *Nfe2l2* expression and genes related to mitochondrial biogenesis and fission process. The hypoxia also decreased ATP levels and increased pyruvate and lactate levels. Prior exposure to all sirtuin modulators increased the viability of astrocytes and neurons, by increasing *Nfe2l2* expression and decreasing ROS production. In astrocytes, there was still stimulation of mitochondrial biogenesis. While in neurons, there was an increase in the production of ATP, pyruvate, lactate, and an increase in the expression of genes related to mitochondrial fusion. Altogether, our results suggest that sirtuins modulators could be used as a protective strategy against hypoxia and contribute to a better understanding of their effects on the central nervous system and to a better understanding of mitochondrial function and its relationship to neurodevelopmental disorders.

Keywords: mitochondria, hypoxia, schizophrenia, and epigenetic modulation

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Hipóxia.....	15
1.2 Metabolismo mitocondrial.....	16
1.3 Alteração da função mitocondrial induzida pela hipóxia.....	19
1.4 Neurodesenvolvimento e a função mitocondrial .....	24
1.5 Esquizofrenia e função mitocondrial.....	26
1.5.1 Esquizofrenia e neurodesenvolvimento.....	29
1.6 Modulação epigenética e neuroproteção .....	33
1.7 Atividades realizadas no projeto .....	36
1.8 Objetivos .....	38
1.8.1 Objetivos secundários .....	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
2.1 Modelos animais .....	39
2.1.1 Ratos espontaneamente hipertensos .....	40
2.2. Grupos experimentais .....	40
2.3 Cultura primária de astrócitos.....	41
2.4 Cultura primária de neurônios .....	42
2.5 Caracterização dos modelos celulares .....	43
2.5.1 Imunofluorescência.....	44
2.5.2 Citometria de fluxo.....	45
2.6 Viabilidade celular frente à hipóxia química e moduladores de sirtuínas .....	46
2.7 Verificação da ativação da hipóxia pelo $\text{CoCl}_2$ .....	48
2.8 Investigação da modificação epigenética por Western-Blot .....	49
2.9 Investigação do metabolismo mitocondrial – estudo funcional.....	51
2.9.1 Homeostase de cálcio .....	52
2.9.2 Potencial de membrana mitocondrial (TMRE).....	53
2.9.3 Homeostase Redox.....	53
2.9.3.1 Avaliação da peroxidação lipídica (MDA).....	55
2.9.4 Avaliação dos compostos altamente energéticos.....	55
2.9.5 Avaliação da função neural – Western-blot.....	57
2.9.6 Investigação do metabolismo e dinâmica mitocondrial – PCR em tempo real .....	58
2.9.7 Análise da quantidade de mitocôndrias.....	59
2.9.8 Análise estatística.....	60
3 RESULTADOS .....	61
3.1 Resultados Astrócitos.....	62

3.1.1 Caracterização da cultura primária de astrócitos - Imunofluorescência .....	62
3.1.2 Viabilidade frente aos moduladores de sirtuínas .....	65
3.1.3 Viabilidade celular: Hipóxia química versus moduladores de sirtuínas .....	68
3.1.4 Investigação da modificação epigenética – Western-Blot .....	71
3.1.5 Investigação do metabolismo mitocondrial – estudo funcional .....	74
3.1.5.1 Homeostase de $Ca^{2+}$ .....	74
3.1.5.2 Potencial de membrana mitocondrial.....	77
3.1.5.3 Níveis de superóxido mitocondrial .....	79
3.1.6 Investigação do metabolismo mitocondrial – PCR em tempo real.....	81
3.1.7 Análise da quantidade de mitocôndrias – Imunofluorescência.....	91
Tabela 1: resumos dos resultados – seção astrócitos .....	93
Tabela 2: resumos dos resultados – seção astrócitos .....	94
3.2 Resultados Neurônios .....	95
3.2.1 Caracterização da cultura primária de neurônios – Imunofluorescência .....	95
3.2.3 Viabilidade celular frente a hipóxia e moduladores de SIRTs .....	100
3.2.3.1 Viabilidade celular: Hipóxia química versus moduladores de sirtuínas .....	105
3.2.4 Modelo celular de hipóxia química - qPCR.....	108
3.2.5 Investigação da modificação epigenética – Western-Blot.....	111
3.2.6 Investigação do metabolismo mitocondrial entre animais controle (Wistar e SHR) – estudo funcional.....	113
3.2.6.1 Homeostase de $Ca^{2+}$ , potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS gerais e superóxido mitocondrial .....	113
3.2.6.2 Análise da peroxidação lipídica .....	115
3.2.6.3 Avaliação dos níveis dos compostos altamente energéticos.....	117
3.2.6.4 Investigação do metabolismo mitocondrial – PCR em tempo real.....	119
3.2.7 Investigação do metabolismo mitocondrial em animais controle (Wistar) e SHR após a hipóxia química e modulação das SIRTs – estudo funcional .....	122
3.2.7.1 Homeostase de $Ca^{2+}$ .....	122
3.2.7.2 Potencial de membrana mitocondrial.....	124
3.2.7.3 Níveis de ROS gerais.....	126
3.2.7.4 Níveis de superóxido mitocondrial .....	128
3.2.7.5 Avaliação da peroxidação lipídica .....	130
3.2.7.6 Avaliação dos compostos altamente energéticos.....	132
3.2.7.7 Investigação do metabolismo mitocondrial – PCR em tempo real.....	139
3.2.8 Análise da função neural.....	151
Tabela 3: resumos dos resultados – seção neurônios .....	158
Tabela 4: resumos dos resultados – seção neurônios Wistar .....	159

Tabela 5: resumos dos resultados – seção neurônios SHR .....	160
4 DISCUSSÕES.....	161
4.1 Discussão astrócitos .....	161
4.2 Conclusões - astrócitos.....	168
4.3 Discussão neurônios.....	170
4.3.1 Função neural.....	180
4.4 Conclusões - Neurônios.....	182
REFERÊNCIAS.....	185
ANEXO A: Neuroesferas .....	208
ANEXO B: Padronização da co-cultura entre neurônios e astrócitos.....	216
ANEXO C: Projeto de Colaboração .....	218
ANEXO D: Programa Rutherford Fellowship – Estágio na Universidade de Birmingham .....	223



## 1 INTRODUÇÃO

Para entendermos os mecanismos associados a desordem do neurodesenvolvimento relatada neste projeto, devemos compreender os conceitos primários sobre hipóxia e função mitocondrial para que consigamos entender como a epigenética e sua modulação podem ser utilizadas como estratégias terapêuticas.

### 1.1 Hipóxia

Uma situação de hipóxia é caracterizada por baixas tensões de oxigênio ( $O_2$ ), especificamente, abaixo de 5% (Semenza, 2012; Semenza, 2014). Nessas condições, as células adaptam seu metabolismo a fim de prover energia mesmo com a redução de  $O_2$ . Essas adaptações celulares são impulsionadas pela família dos fatores induzíveis de hipóxia, do inglês, *hypoxia inducible factors* ou HIFs. O principal componente dessa família e ativador da resposta adaptativa da célula é o *hypoxia inducible factor 1 alpha* (HIF1 $\alpha$ ). Foi demonstrado que a ativação do HIF1 $\alpha$  é essencial para a regulação e transcrição de genes que atuam na adaptação das células em situações de hipóxia a fim de sustentar a homeostase energética (Semenza et al., 1994; Semenza et al., 1996; Solaini et al., 2010; Semenza, 2012; Semenza, 2014; Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020).

O fator HIF1 $\alpha$  é constitucionalmente transcrito, mas, em condições de normoxia (tensões normais de  $O_2$ ), os resíduos prolinos do fator são constantemente hidroxilados pelas prolin-hidroxilases (PHDs). Essa reação é catalisada pela presença de dioxigenases dependentes de ferro ( $Fe^{2+}$ ), do substrato intermediário do ciclo do ácido cítrico (TCA), o 2-oxoglutarato, e de oxigênio (Semenza et al., 1994; Semenza et al., 1996; Solaini et al., 2010; Semenza, 2012; Semenza, 2014; Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020). Esse processo modifica a estrutura molecular do HIF1 $\alpha$ , gerando succinato e dióxido de carbono. Após a hidroxilação, as proteínas Von Hippel-Lindau (pVHLs), que são membros da E2 ubiquitinas, se ligam ao HIF1 $\alpha$  marcando-o para a ubiquinização e, posteriormente, a degradação proteossomal (Semenza, 2012; Semenza, 2014; Solaini et al., 2010; Fuhrmann e Brune, 2017). Quando em hipóxia, as mitocôndrias funcionam como uma espécie de sensor para baixas tensões de  $O_2$ , modificando seu metabolismo, gerando menos 2-oxoglutarato via TCA e mais espécies reativas de oxigênio (ROS), que oxidarão o  $Fe^{2+}$  para  $Fe^{3+}$  e, conseqüentemente, inibirão a ação das PHDs (Fuhrmann e Brune, 2017). Nesse sentido, há uma estabilização dos níveis de HIF1 $\alpha$ . Este, por sua vez,

migrará para o núcleo, se dimerizará com sua subunidade beta (HIF1 $\beta$ ), e irão reconhecer regiões responsivas a hipóxia (HREs), promovendo a transcrição de genes que atuarão na adaptação celular a condição de redução de O<sub>2</sub> (Semenza et al., 1994; Semenza et al., 1996; Solaini et al., 2010; Semenza, 2012; Semenza, 2014; Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020).

As modificações promovidas pelo HIF1 $\alpha$  funcionam como um botão de pânico, mas são potencialmente perigosas se usadas em excesso. Isso porque em excesso, tal ativação pode induzir uma redução drástica de ATP e aumento considerável de ROS, o que pode ter consequências desfavoráveis a longo prazo (Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020). Vale ressaltar, que a proteção ou vulnerabilidade cerebral durante o desenvolvimento estão intimamente relacionadas com a alta necessidade metabólica que é alterada no estado de hipóxia (Baburamani et al., 2015). O motivo para isso é que o cérebro é o maior consumidor de energia e, por essa razão, é particularmente suscetível a hipóxia (Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020; Sharp e Bernaudin, 2004).

## **1.2 Metabolismo mitocondrial**

As mitocôndrias são organelas esféricas ou alongadas que medem cerca de 0.5 e 1.0  $\mu$ M de largura e até 10  $\mu$ M de comprimento, sendo sua quantidade relacionada com a necessidade energética de cada tecido (Rosenstock e Rego, 2012; Lackner, 2013; Lavie et al., 2017; Pafner et al., 2019; Sainero-Alcolado, 2022). As mitocôndrias possuem duas membranas lipídicas chamadas de membrana externa mitocondrial (OMM) e membrana interna mitocondrial (IMM). Entre a OMM e a IMM, temos o espaço intermembrana (IMS). E, o espaço dentro da IMM é denominado de matriz mitocondrial.

Na OMM, temos canais denominados de porinas, que permitem a passagem (transporte passivo) de moléculas pequenas, como a glicose e íons para o IMS. A IMM é menos permeável, sendo maior em largura que a OMM, apresentando inúmeras vilosidades, chamadas de cristas mitocondriais. As cristas mitocondriais se projetam para a matriz mitocondrial, e é onde se localiza um conjunto proteico/enzimático denominado de cadeia transportadora de elétrons (ETC). Este, é responsável pela respiração celular através do processo da fosforilação oxidativa (OXPHOS) (Kandenbach, 2012; Lackner, 2013; Pfaner et al, 2019; Lavie et al., 2017).

O processo da OXPHOS é uma via metabólica onde as células usam os complexos da ETC para gerar adenosina trifosfato (ATP). Na ETC, existem cinco complexos (Lackner, 2013; Chaban et al., 2014; Lavie et al., 2017; Pafnner et al., 2019; Sainero-Alcolado, 2022). Os complexos 1, 3 e 4 são compostas por subunidades codificadas pela DNA nuclear e mitocondrial que bombeia prótons entre a IMM e a IMS, gerando um gradiente eletroquímico ou potencial de membrana mitocondrial (MMP). Este, por sua vez, será utilizado pelo complexo 5 (ATP sintetase) para converter adenosina difosfato (ADP) em ATP. O complexo 2 é a enzima responsável pela oxidação do succinato, dando continuidade à geração de elétrons para o complexo 3, porém, esse complexo não bombeia próton para a IMS e é o único transcrito somente pelo DNA nuclear (Chaban et al., 2014). Os combustíveis para a fosforilação oxidativa são *nicotinamide adenine dinucleotide* (NADH) e *flavin adenine dinucleotide* (FADH<sub>2</sub>), gerados pela glicólise, pela oxidação de ácidos graxos e pelo ciclo do ácido cítrico (TCA).

O processo de glicólise se inicia com uma proteína localizada na membrana externa mitocondrial, a hexoquinase (HK) que utiliza um ATP para converter a glicose em glicose-6-fosfato (G6P). A G6P é convertida em frutose-6-fosfato (F6P) pela enzima fosfoglicose isomerase (PGI), na sequência, a F6P é convertida pela fosfofrutoquinase-1 (PFK) (usando um ATP), para frutose-1,6-bifosfato (F1,6P). Em diante, haverá a formação de gliceroaldeído-3-fosfato (G3P) pela ação da enzima aldolase (ALD). A conversão de G3P em 1,3-bifosfoglicerato (1,3BPG) pela gliceroaldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) produz 2 moléculas de NADH a partir de 2 moléculas de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD<sup>+</sup>). Em sequência, a 1,3BPG é convertida em 3-fosfoglicerato (3PG) pela fosfoglicerato quinase (PGK), transferindo energia para duas moléculas de ADP, formando duas moléculas de ATP. A 3PG é então convertida em 2-fosfoglicerato (2PG) pela fosfoglicomutase (PGM) gerando H<sub>2</sub>O molecular. A partir daí, haverá a conversão da 2PG em fosfoenolpiruvato (PEP) pela enolase (ENO). Na última etapa da via, o PEP é convertido pela piruvato quinase (PK) em piruvato, gerando duas moléculas de ATP. Assim, como resultado, cada molécula de glicose, pela glicólise, gera duas moléculas de ATP, de NADH e de piruvato (Lackner, 2013; Chaban et al., 2014; Lavie et al., 2017; Pafnner et al., 2019; Sainero-Alcolado, 2022).

Em um processo metabólico normal, o piruvato permeia as membranas mitocondriais através de um carreador chamado de carreador de piruvato (MPC)

(Bender e Martinou, 2016). Na matriz mitocondrial o piruvato é convertido pelo complexo piruvato desidrogenase (PDH) em acetil-coa, dando início ao ciclo do ácido cítrico (TCA). A primeira reação do TCA converte o acetil-coa mais oxaloacetato em citrato pelo citrato sintetase. O citrato é então convertido pela aconitase em isocitrato, que por sua vez, é convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato pela isocitrato desidrogenase. Como substrato é formando NADH. Em sequência, o  $\alpha$ -cetoglutarato é convertido em succinil-coa pela  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, essa reação também forma NADH. Então, a succinil-coa é convertida em succinato pela succinil-coa desidrogenase. Na sexta reação, o succinato é convertido em fumarato pela succinato desidrogenase, gerando  $FADH_2$ . O fumarato será então convertido para malato, pela fumarase e o malato será convertido em oxaloacetato pela malato desidrogenase, também gerando NADH. Essa última reação reinicia o TCA (Lackner, 2013; Chaban et al., 2014; Bender e Martinou, 2016; Lavie et al., 2017; Pafnner et al., 2019; Reyes e Chandel, 2020; Sainero-Alcolado, 2022). Como resultado, tem-se seis moléculas de NADH e duas de  $FADH_2$ , que são utilizadas pela OXPHOS.

Quando o MMP está polarizado, se tem o gradiente eletroquímico para a transferência de elétrons que se dá entre os complexos e por suas subunidades estruturais. O complexo 1 ou NADH desidrogenase é a maior enzima da cadeia respiratória e possui forma de “L”, com uma parte extensa incorporada na bicamada lipídica e uma menor que se projeta para a matriz mitocondrial. Esse complexo é responsável pela oxidação do NADH, promovendo o transporte de elétrons e bombeando prótons para a IMS (Lackner, 2013; Chaban et al., 2014; Bender e Martinou, 2016; Lavie et al., 2017; Pafnner et al., 2019; Reyes e Chandel, 2020; Sainero-Alcolado, 2022). O complexo 2, ou succinato desidrogenase ( $FADH_2$  desidrogenase), é um complexo que também é capaz de fornecer elétrons para a cadeia respiratória, utilizando como substrato o  $FADH_2$  (Chaban et al., 2014). O complexo 3 ou citocromo C oxidoreductase localiza-se entre o espaço interno da mitocôndria e projeta-se para a matriz mitocondrial. Esse complexo mitocondrial é essencial para a formação e a manutenção do MMP, pois possui a capacidade enzimática tão forte que é capaz de bombear dois prótons para a IMS. O complexo 4 ou citocromo C oxidase possui a capacidade de oxidar moléculas de  $O_2$  molecular, que são convertidas em água metabólica pela energia fornecida pelo complexo 3 em associação com um próton ( $H^+$ ) presente na matriz mitocondrial. Por fim, se tem o

complexo 5, que utiliza a força próton-motriz gerada pelos outros complexos (1, 3 e 4) para a formação do ATP (Lackner, 2013; Chaban et al., 2014; Bender e Martinou, 2016; Lavie et al., 2017; Pafnner et al., 2019; Reyes e Chandel, 2020; Sainero-Alcolado, 2022). Para cada molécula de glicose, em condições normais, são produzidas de trinta a trinta e duas moléculas de ATP (Lackner, 2013; Chaban et al., 2014; Bender e Martinou, 2016; Lavie et al., 2017; Pafnner et al., 2019; Reyes e Chandel, 2020; Sainero-Alcolado, 2022).

É importante mencionar, que não há apenas uma cadeia respiratória por mitocôndria. De fato, nas cristas mitocondriais existem diversos complexos que desempenham um papel em conjunto. Ainda, vale dizer que há vazamento de elétrons da cadeia respiratória, especificamente no complexo 3 e 4, que podem reagir com O<sub>2</sub> molecular gerando o radical superóxido, que em condições normais, é considerado um subproduto do metabolismo mitocondrial e é rapidamente neutralizado por enzimas antioxidantes (Lackner, 2013; Chaban et al., 2014; Lavie et al., 2017; Pafnner et al., 2019; Sainero-Alcolado, 2022).

### **1.3 Alteração da função mitocondrial induzida pela hipóxia**

Como vimos, as mitocôndrias são responsáveis pelas reações de redução que geram energia para a célula. Contudo, em hipóxia, sua função é afetada negativamente, uma vez que elas consomem de 85 a 90% de todo o O<sub>2</sub> para a produção de ATP (Sanderson et al., 2015). Conseqüentemente, as mitocôndrias modulam e modificam sua forma e tamanho, dividindo-se ou fundindo-se para misturar seus metabólitos, bem como as cópias do DNA mitocondrial (mtDNA), numa tentativa de se ajustar às alterações e demandas energéticas, e de manter a homeostase celular (Rosenstock e Rego, 2012).

Em curtos períodos de hipóxia, a eficiência catalítica de algumas enzimas é aumentada, como a fosfofrutoquinase-1 e a piruvato quinase, fomentando a glicólise e favorecendo o metabolismo energético anaeróbico (Solaini et al., 2010; Koos, 2011; Semenza, 2012, Semenza, 2014; Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020). Conforme a hipóxia se prolonga, se torna mais severa, então as mitocôndrias passam a agir como uma espécie de sensor para baixas concentrações de O<sub>2</sub> e, como falamos, sinalizam para impedir a degradação do HIF1 $\alpha$ , aumentando sua disponibilidade e impulsionando novas adaptações celulares para lidar com a falta de O<sub>2</sub> (Solaini et al., 2010; Koos, 2011; Semenza, 2012; Semenza, 2014; Fuhrmann

e Brune, 2017; Lee et al., 2020). Nesse sentido, há a transcrição de genes induzidos pelo HIF1 $\alpha$  que facilitam a sustentabilidade da homeostase energética (Hamanaka e Chancel, 2010; Semenza, 2012; Semenza, 2014). Entretanto, essas adaptações fornecem uma sustentabilidade limitada e, devido a isso, o tempo de exposição e a severidade da hipóxia são fatores cruciais para a sobrevivência da célula (Solaini et al., 2010; Koos, 2011; Semenza, 2012; Semenza, 2014; Sanderson et al., 2015; Hamanaka et al., 2016; Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020).

A relação da mitocôndria com a hipóxia é complexa e extensa. Foi demonstrado que a ativação do HIF1 $\alpha$  acarreta um aumento da subunidade COX4-2 do citocromo c oxidase (complexo 4) da cadeia respiratória mitocondrial e uma diminuição da subunidade COX4-1. E essa inversão garante uma diminuição do funcionamento da cadeia respiratória, evitando o gasto de O<sub>2</sub> e impedindo que a mitocôndria funcione inadequadamente. Entretanto, como consequência, se tem o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo vazamento de elétrons, o que pode gerar estresse oxidativo e, também, há a despolarização do MMP pela diminuição na OXPHOS (Solaini et al., 2010; Koos, 2011; Semenza, 2012; Semenza, 2014, Sanderson et al., 2015; Hamanaka et al., 2016; Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020). Ainda, a ação do HIF se estende a diversas enzimas da via glicolítica, aumentando, por exemplo, os canais transportadores de glicose (GLUT1), a atividade catalítica da HK (iniciador da via), fomentando a piruvato desidrogenase quinase 1 (enzima que degrada a PDK, que converte piruvato para acetil-coa) e a lactato desidrogenase 1 (que converte piruvato para lactato). É importante mencionar, que a conversão do piruvato para lactato, regenera o NAD<sup>+</sup> que é reutilizado na glicólise (Solaini et al., 2010; Koos, 2011; Semenza, 2012; Semenza, 2014; Sanderson et al., 2015; Hamanaka et al., 2016; Fuhrmann e Brune, 2017; Magistretti e Alaman, 2018; Lee et al., 2020).

As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas, coordenando eventos de fissão e fusão mitocondrial para manter sua forma, massa e distribuição para se ajustar às demandas energéticas das células. Ainda, as mitocôndrias também participam de diversos outros processos celulares, como apoptose e do próprio controle de qualidade mitocondrial, ou mitofagia, de forma interessante, todos esses processos são alterados no estado de hipóxia (Fuhrmann e Brune, 2017; Tilkani et al., 2018; Lee et al., 2020).

O mecanismo de fissão mitocondrial é caracterizado pela divisão das mitocôndrias em duas, ou mais mitocôndrias menores. Por outro lado, o processo de fusão é justamente o oposto, ou seja, é a junção de pequenas mitocôndrias em uma maior. A fissão é ativada para remodelar a rede de mitocôndrias durante a divisão celular, para facilitar seu transporte para espaços pequenos e para segregar partes disfuncionais da mitocôndria promovendo sua reciclagem, ou mitofagia, que falaremos mais adiante. Dentre os fatores que aumentam a fissão, temos inibição da OXPHOS, aumento dos níveis de ROS e despolarização do MMP (Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020).

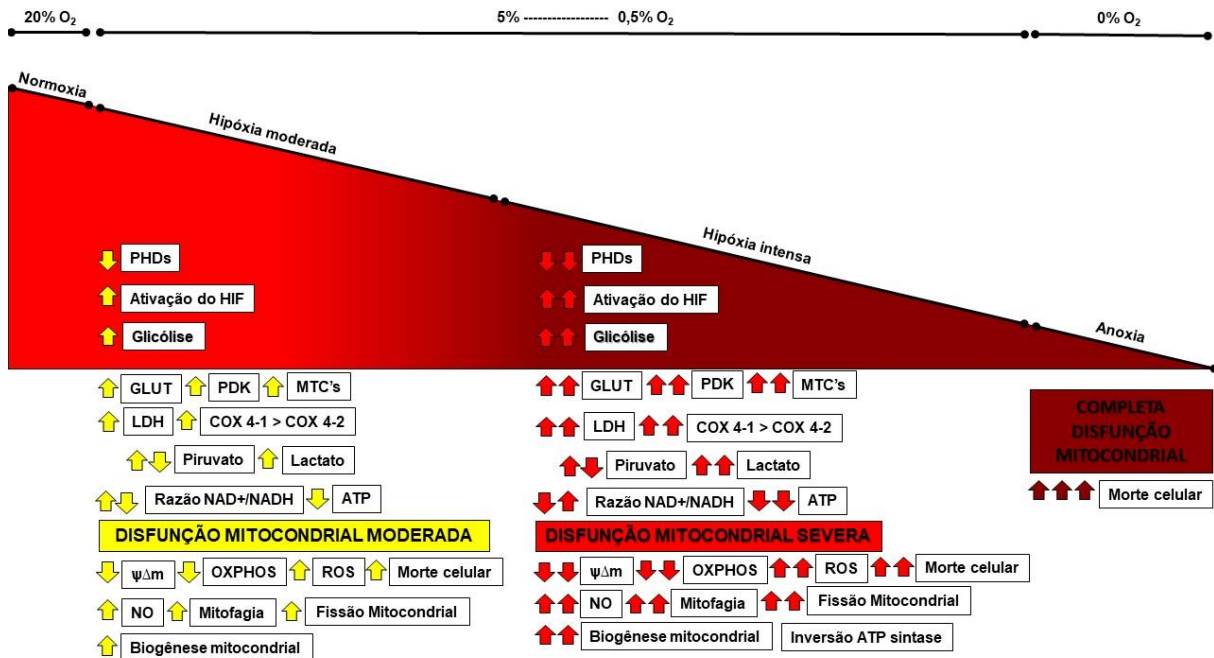
Resumidamente, o processo de fissão em si, começa pela divisão do mtDNA que marca o local onde deve ocorrer a fissão. Nesse sentido há o recrutamento do retículo endoplasmático, que se conecta à mitocôndria, formando uma espécie de sinalização para o sítio de divisão na OMM e na IMM. Em diante, uma proteína encontrada no citosol, a *dynamin-related-like protein 1* (DRP1) é recrutada para esse sítio sinalizado na OMM por diversas proteínas, entre elas a *mitochondrial fission protein 1* (FIS1) formando um oligômero na área demarcada proporcionando a fissão das organelas (Toule e Bliiek, 2012; Fuhrmann e Brune, 2017; Tilokani et al., 2018; Ren et al., 2020; Liu et al., 2020). Quando em hipóxia, há o estímulo da *E2 ubiquitin-protein ligase* (SIAH2) que impede a ação da *a-kinase anchoring protein 121* (AKAP121) que inibe a ação do DRP1, assim, proporcionando a ativação da via (Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020).

Em contraste, a fusão das mitocôndrias é estimulada a fim de aumentar o metabolismo energético, permitindo uma troca e conexão do conteúdo mitocondrial e para fomentar processos antioxidantes e manter o MMP. O mecanismo de fusão também é coordenado por proteínas na OMM como a *mitofusin protein 1 e 2* (MFN 1 e 2) e pela *optic atrophy 1* (OPA 1), que se localiza na IMM. Resumidamente, quando há a necessidade de fusão, duas mitocôndrias se conectam através das proteínas MFN 1 e 2, conectando as OMMs. Na sequência, há a interação das MFNs com a OPA 1, o que propicia a ligação das IMM (Toule e Bliiek, 2012; Fuhrmann e Brune, 2017; Tilokani et al., 2018; Ren et al., 2020; Liu et al., 2020). Nesse sentido, quando há uma disfunção mitocondrial, como ocorre nos períodos de hipóxia, por exemplo, estimula-se a fissão, e a fusão tende a ficar inibida (Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020; Ma et al., 2020).

A fissão favorece ainda o processo de reciclagem das organelas, ou mitofagia. A mitofagia faz parte do processo de reciclagem celular chamado de autofagia, só que trata especificamente das mitocôndrias. Em casos de estresse mitocondrial, há o recrutamento de duas proteínas a *PTEN-induced kinase 1* (PINK1) e *parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase* (PARKIN). A proteína PINK 1 se acumula na OMM após um estresse (como a hipóxia), e forma um complexo com as proteínas de translocação de membrana externa mitocondrial (TOM). Caso a célula contorne os efeitos nocivos do estresse metabólico, esse complexo é inativado e a PINK 1 degradada. Porém, se o oposto ocorrer, esse complexo atua ativando a PINK 1 que, por sua vez, recruta a proteína PARKIN. O conjunto PINK/PARKIN interage então com o *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3) permitindo o engolfamento das mitocôndrias disfuncionais pelo autofagossomo e, posteriormente, ocorrerá a degradação lisossomal (Quinn et al., 2020; Ge et al., 2020). De forma interessante, o HIF1 $\alpha$  interage com *BCL2 interacting protein 3* (BNIP3) e *BCL2 interacting protein 3 like* (BNIP3L), proteínas envolvidas no processo de autofagia, propiciando a ativação da proteína beclina 1 (BECN1) que é parte essencial do processo. Assim, a hipóxia induz também, diretamente por uma via independente da PINK/PARKIN, a reciclagem de mitocôndrias disfuncionais pela via HIF-BNIP3 (Fuhrmann e Brune, 2017; Tilokani et al., 2018; Ren et al., 2020; Pickles et al., 2020; Liu et al., 2020; Quinn et al., 2020; Ge et al., 2020). Nesse contexto, a ação do HIF é, de fato, um botão de pânico, sendo crucial para a sobrevivência celular nos períodos de falta de O<sub>2</sub> (Figura 1). Uma das formas de estudar as disfunções ocasionadas pela hipóxia é a verificação da função mitocondrial. De fato, diversos grupos, incluindo o nosso, já demonstraram que a hipóxia pode desregular a função mitocondrial causando prejuízos energéticos (Solaini et al., 2010; Sanderson et al., 2015; Hamanaka et al., 2016; Fuhrmann e Brune, 2017; Magistretti e Alaman, 2018; E Silva et al., 2019; Lee et al., 2020; Ren et al., 2020; Pickles et al., 2020; Liu et al., 2020; Quinn et al., 2020; Ge et al., 2020).



**Figura 1:** Modificações impulsionadas pela hipóxia e suas consequências na função mitocondrial



**Legenda:** quando as células estão em uma tensão menor do que 5% de oxigênio elas estão em hipóxia. Conforme essa situação se prolonga, torna-se mais severa, modificando a expressão de genes que atuam na captação de glicose (GLUT), aumentando a atividade de enzimas glicolíticas, como a PDK e LDH, diminuindo a OXPHOS e os níveis de ATP, enquanto aumenta os níveis de piruvato e lactato. A hipóxia provoca ainda a despolarização do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), e aumenta os níveis de ROS, diminuindo a viabilidade celular. Como mecanismo compensatório, se tem a indução das vias de fissão mitocondrial, mitofagia e biogênese mitocondrial. Caso não haja mais oxigênio (anoxia), a célula entra em colapso metabólico, onde há uma total disfunção mitocondrial aumentando ainda mais a morte celular.

#### 1.4 Neurodesenvolvimento e a função mitocondrial

O desenvolvimento do tecido cerebral (neurodesenvolvimento) se inicia na fase pré-natal, nas 3ª e 4ª semanas de gestação (em humanos) e continua até os 20-24 anos de idade (Son e Han, 2018; Fritsche et al., 2018).

O neurodesenvolvimento se inicia com a formação do tubo neural no período embrionário e fetal. Esse estágio é caracterizado pela proliferação celular (0-20 semanas de gestação) e pela diferenciação das células-tronco neurais, ou *neuro stem cells* (NSCs) em células progenitoras neurais e gliais, ambas com intensa capacidade proliferativa (Son e Han, 2018; Fritsche et al., 2018). A neurogênese, é definida como a divisão, proliferação e diferenciação das células progenitoras neurais; isso também vale para a gliogênese, só que com as células progenitoras gliais

Hoje sabemos que todos os processos relacionados com a proliferação, diferenciação e migração neuronal são dependentes da disponibilidade de ATP e, portanto, da quantidade e do bom funcionamento das mitocôndrias (Vayssiere et al., 1992; Mattson et al., 2008; Agostini et al., 2016; Calió et al., 2020;). Durante o neurodesenvolvimento, há uma reprogramação do funcionamento celular a fim de promover o aumento da função mitocondrial e da quantidade de mitocôndrias a fim de suprir a nova demanda energética (Agostini et al., 2016; Calió et al., 2020).

As mitocôndrias são, ainda, de extrema importância para a própria estrutura neuronal, já que para a formação de axônios e dendritos (cone de crescimento axonal e filopódio, respectivamente), os neurônios devem ser ricos nessa organela (Lin-Hendel et al., 2016; Calió et al., 2020).

Estando o neurônio diferenciado e estruturado, as mitocôndrias passam a ser fundamentais para a formação (sinaptogênese) e manutenção de sinapses (Devine e Kittler, 2018; Calió et al., 2020; Siena et al., 2021). Sabe-se que a formação de sinapses é um processo dependente de mitocôndrias (Devine e Kittler, 2018) e que o alto número de mitocôndrias na sinapse é de suma importância (Palay et al., 1957; Devine e Kittler, 2018;).

Para que ocorra a sinapse de fato, os níveis de ATP e de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) citosólico devem ser bem coordenados, pois as proteínas envolvidas no processo de formação das vesículas contendo os neurotransmissores, bem como no processo de liberação do neurotransmissor na fenda sináptica são dependentes de ambos esses fatores (Vos et al., 2010; Südhof, 2012; Pathak et al., 2015). Vale

mencionar, que é necessário que essas organelas trafeguem até o terminal axonal (migração) para que as membranas das vesículas, contendo os neurotransmissores, sejam fundidas à membrana plasmática do neurônio (processo dependente de ATP e  $Ca^{2+}$ ). Essa dinâmica (movimentação) mitocondrial acontece ao longo dos microtúbulos com o auxílio de diversas proteínas do citoesqueleto, como a de ancoragem *anchorage mitochondrial Rho GTPase* (MIRO) e a de transporte, *milton motor-adaptor* (MILTON). Essas proteínas formam um complexo MIRO-MILTON que se liga à OMM e a proteína *kinesin family member 5B* (KIF5B), permitindo o deslocamento das organelas para as regiões onde são necessárias (Devine e Norkett, 2016; Devine e Kittler, 2018; Calió et al., 2020; Siena et al., 2021).

Após a proliferação celular, a diferenciação e a sinaptogênese, ocorre o processo denominado de mielinização, que se inicia após o nascimento e continua na idade adulta (Williamson e Lyons, 2018). A mielinização consiste no envolvimento do axônio neuronal por oligodendrócitos formando a bainha de mielina, promovendo uma condução elétrica rápida e eficiente ao longo dos axônios, ajudando a preservar a integridade axonal (Barateiro et al., 2016). A mitocôndria parece ser um mediador essencial desse processo, uma vez que está envolvida no tamponamento de  $Ca^{2+}$  e na produção de ATP (Zehnder et al., 2021).

Após o nascimento e, especialmente durante os primeiros meses de vida pós-natal, o nível de sinapses é 50% maior do que na idade adulta (Peter, 1979; Glantz et al., 2007). Portanto, pode-se supor que pelo menos parte dessas sinapses são erradicadas ao longo da vida. De fato, a eliminação e remodelação sináptica em humanos são essenciais para manter a homeostase cerebral (Paolicelli et al., 2011). Essa abolição de sinapses desnecessárias ou extras é chamada de poda (*pruning*), e depende do aporte energético mitocondrial. A poda neural é o último processo do neurodesenvolvimento, concluindo-se entre os 20-24 anos do indivíduo (Peter, 1979; Glantz et al., 2007; Petanjek et al., 2011; Huang et al., 2011; Huang et al. al., 2015; Fritsche et al., 2018; Son e Han, 2018; Calió et al., 2020).

Como vimos, as mitocôndrias são organelas não somente de extrema necessidade para a manutenção energética tecidual, como também para o próprio desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central. Portanto, alterações ao longo do neurodesenvolvimento, causados por períodos de hipóxia, que por sua

vez modificam o metabolismo e dinâmica mitocondrial, são correlacionados com diversos transtornos neuropsiquiátricos como a esquizofrenia (SZ) (Ben-Shachar e Karry 2008; Martins-de-Souza et al., 2009; Rajasekaran et al., 2015; Roberts et al., 2015; E Silva et al., 2019; Calió et al., 2020; Siena et al., 2021; Roberts, 2021).

### **1.5 Esquizofrenia e função mitocondrial**

A SZ é um transtorno mental crônico, multifatorial e debilitante que afeta a forma como o indivíduo pensa, sente e se comporta, tornando a noção de realidade distorcida. É importante ressaltar que o transtorno esquizofrênico está associado a um risco 2 a 3 vezes maior de mortalidade (Laurson et al., 2007; Nielsen et al., 2013; Suvisaari et al., 2013; Kahn et al., 2015), e uma redução de 10 a 30 anos na expectativa de vida (Colton e Manderscheid, 2006; Chang et al., 2011; Nordentoft et al., 2013).

A principal característica da SZ é a presença de psicose, termo usado para descrever condições que afetam a mente, como a perda da realidade (Insel, 2010). O início da psicose pode ser precedido por semanas, meses ou mesmo anos de anormalidades comportamentais e psicológicas, como isolamento social acentuado, discurso excessivamente elaborado, circunstancial ou pobre, falta de iniciativa, interesse ou energia; esse período é chamado de fase prodrômica (Larson et al., 2011; George et al., 2017). Após esse período, os pacientes podem ou não desenvolver uma queixa de psicose denominada primeiro episódio psicótico (PEP) (entre 18-26 anos) (George et al., 2017). Após o diagnóstico de SZ, que é clínico, os sintomas dos pacientes são divididos principalmente em três grupos: positivos, negativos e cognitivos (Larson et al., 2011; Kahn et al., 2015; Davis et al., 2016; Weinberger, 2017; Murray et al., 2017).

Os sintomas positivos são caracterizados por perda da realidade, alucinações, delírios, distúrbios do pensamento e agressão. Por outro lado, os sintomas negativos são caracterizados por embotamento afetivo, apatia, fala pobre e desorganizada, falta de prazer e retraimento social. Os sintomas cognitivos envolvem déficit de atenção, empobrecimento das funções executivas, memória e comportamento psicomotor (Davis et al., 2016; George et al., 2017; Murray et al., 2017; Stępnicki et al., 2018).

Por ser um transtorno multifatorial, existem muitas teorias para explicar os mecanismos por trás da fisiopatologia e a neurobiologia da SZ, algumas delas

envolvem a função mitocondrial. No histórico da SZ, sua primeira relação com a disfunção mitocondrial foi descrita no ano de 1999, onde foi observado uma alta atividade do complexo 1 da cadeia respiratória, e uma baixa atividade do complexo 4, em plaquetas de pacientes medicados e não medicados (Ben-Shachar et al., 1999).

Foi evidenciado uma série de alterações mitocondriais em neurônios e células gliais de modelos animais de SZ, e em células derivadas de *induced pluripotent stem cells* (iPSC), tecido cerebral (*post-mortem*), células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), soro, plasma, entre outras amostras de pacientes com o transtorno esquizofrênico (Prabakaran et al., 2004; De Oliveira et al., 2011; Verge et al., 2011, Ichikawa et al., 2012; Faizi et al., 2014; Rajasekaran et al., 2015; E Silva et al., 2019; Roberts, 2021; Nagaoka et al. al., 2020).

Nos estudos *post-mortem*, análises proteômicas revelaram déficits no metabolismo energético na área de wernicke, bem como alterações na glicólise no tálamo e alteração da homeostase do  $Ca^{2+}$  no córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) (Martins-de-Souza et al., 2009; Martins-de-Souza et al., 2011). Uma revisão mais recente, com foco em análises proteômicas de diferentes áreas do cérebro *post-mortem* de indivíduos com SZ, foi revelado uma diminuição na produção de ATP juntamente com uma redução nos níveis proteicos que formam os complexos 1, 3 e 4, e no número de cópias do mtDNA (Roberts, 2021).

Ainda, em um ensaio metabolômico usando PBMCs de pacientes com SZ, sem uso de medicamentos, foram observadas alterações nas vias da glicólise, TCA e OXPHOS. Houve aumento de glicose 6-fosfato, frutose, frutose 6-fosfato, glicerato, ácido succínico e ribose 5-fosfato, e diminuição de gliceraldeído-3-fosfato e do próprio ácido cítrico (Liu et al., 2015). Outros trabalhos usando PBMCs de pacientes com o SZ também relataram uma diminuição na atividade de complexo 1, e um aumento na produção de ROS (Mico et al., 2011; Gubert et al., 2013).

Em 2018, Da Silva e colegas também observaram em plaquetas de indivíduos de alto risco para desenvolver SZ, um declínio na atividade do complexo 3 da cadeia respiratória, e intensificação na produção de lactato, que foi relacionado com à gravidade dos sintomas dos pacientes (Da Silva et al., 2018). Outros estudos também encontraram alterações em substratos metabólicos relacionados ao estresse oxidativo em PBMCs, plasma e soro de pacientes com SZ, como aumento de superóxido, ácido tiobarbitúrico, malondialdeído (MDA),

marcadores de dano oxidativo no DNA, como 8-oxodG, bem como aumento de 3-nitrotirosina, relacionado ao estresse nitrosativo (Zhang et al., 2006; Dietrich-muszalska et al., 2009; Dietrich-muszalska and Kontek, 2010; Dietrich-muszalska et al., 2012; Boskoic et al., 2013; Gubert et al., 2013; Bulut et al., 2013; Dietrich-muszalska e Wachowicz, 2017; Chestkov et al., 2018; Dietrich-muszalska et al., 2021).

Em neurônios glutamatérgicos derivados de iPS de pacientes com SZ, foi demonstrando uma redução de subunidades de diferentes complexos da cadeia respiratório mitocondrial, como *NADH:Ubiquinone oxidoreductase Subunit A1* (NDUFA1), *NADH dehydrogenase 2* (MT-ND2), e *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 protein* (MT-ND5), além de uma redução dos níveis de ATP e NAD<sup>+</sup> (Niu et al., 2019). Outro trabalho, também usando neurônios derivados iPS de pacientes, demonstrou diminuição na atividade dos complexos mitocondriais (1, 2, 3 e 4), e de algumas de suas subunidades como, o *NADH:Ubiquinone oxidoreductase Core subunit S1* (NDUFS1) e *cytochrome c oxidase subunit I* (COX 1); esses achados foram relacionados há uma diminuição de 50% na produção de ATP (Li et al., 2019).

As mitocôndrias também estão envolvidas com a teoria dos neurotransmissores na SZ. A dopamina, por exemplo, é metabolizada pela enzima monoamina oxidase (MAO), que é acoplada a OMM (Lakshminarayanan et al., 2019; Ben-Shachar, 2020). Ainda, a dopamina por si só, pode bloquear (reversivelmente) o funcionamento do complexo 1, funcionando como um sinalizador fisiológico para o aumento ou diminuição da razão ADP/ATP (Ben-Shachar, 2020; Rosenfeld et al., 2008). Nesses dois casos, podemos sugerir que prejuízos na função mitocondrial podem acarretar a alterações na sinalização/transmissão dopaminérgica, podendo aumentá-la (devido a incapacidade de degradação) ou diminuí-la (devido ao bloqueio da cadeia respiratória). Portanto, ao longo do neurodesenvolvimento, o estímulo dopaminérgico 'equivocado', resultado de uma incapacidade energética e metabólica mitocondrial, poderia causar anormalidades e/ou vulnerabilidades em toda circuitaria neural.

Em relação ao glutamato, da hipótese glutamatérgica da SZ, as disfunções metabólicas ligadas à disfunção mitocondrial (como na hipóxia) causam um aumento dos níveis de ROS que, conseqüentemente, irão modificar a homeostase

redox causando uma disfunção glutamatérgica via; 1) hipoatividade dos receptores NMDA, 2) degeneração rápida dos interneurônios gabaérgicos, 3) provocando alterações nos oligodendrócitos e uma mielinização inadequada e 4) neuroinflamação (Duarte e Xin, 2019). Portanto, sabendo que a demanda energética cerebral é alta e depende da produção correta de ATP e regulação das espécies reativas de oxigênio, a disfunção glutamatérgica na SZ está certamente ligada a deficiências metabólicas mitocondriais (Calió et al., 2020; Duarte e Xin, 2019).

Ainda, temos o próprio ATP, que quando liberado, pode agir como um co-transmissor (Burnstock, 2006) ligando-se a receptores purinérgicos dos tipos P2X e P2Y ou é transformando-se em ecto-nucleotidases como adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP) e posteriormente em adenosina (ADe); a ADe pode controlar a liberação de inúmeros neurotransmissores, como o glutamato, dopamina, serotonina e acetilcolina, além de inibir a ativação pós-sináptica por hiperpolarização. Assim, a disfunção mitocondrial, via deficiência de ATP, altera inúmeras vias na neurotransmissão.

Como demonstramos, existem evidências da disfunção mitocondrial em tecidos *post-mortem*, PBMCs, iPCs, soro, plasma e na própria neurotransmissão. Porém, essas são respostas fisiológicas adaptativas, ou refletem respostas de uma circuitaria outrora prejudicada. Nesse sentido, para entender de fato, como essas alterações metabólicas acontecem na fisiopatologia e neurobiologia do transtorno, devemos olhar para a SZ como uma desordem do neurodesenvolvimento.

### **1.5.1 Esquizofrenia e neurodesenvolvimento**

Nos últimos anos, diversos estudos têm relacionado anormalidades no neurodesenvolvimento com o surgimento de doenças psiquiátricas, como a SZ. Essas anormalidades seriam causadas por fatores externos que influenciaram o desenvolvimento do tecido cerebral, nomeadamente fatores ambientais (Keshavan et al., 1994; Murray et al., 2017; Roosterman e Cottrel, 2021). A ideia de que a SZ poderia ser uma desordem do neurodesenvolvimento (NDD) surge em 1891, com o pesquisador Thomaz Clouston, que evidenciou alterações em amostras *post-mortem* de pacientes e as relacionou com prejuízos no período de desenvolvimento cerebral (Clouston, 1891). De acordo com sua hipótese, prejuízos na circuitaria neuronal causadas por alterações genéticas levariam a modificações na anatomia

e dinâmica cerebral do feto, o que posteriormente favorece o surgimento da SZ (Clouston, 1891).

Hoje em dia, os estudos que relacionam a SZ como uma NDD estão ganhando importância e destaque, relacionado não apenas eventos genéticos, mas também epigenéticos, com muita influência ambiental (ou fatores ambientais), que alterariam o neurodesenvolvimento em períodos críticos, como no período fetal (Owen e O'Donovan, 2017; Patel et al., 2021). Dentre os fatores ambientais estudados pelos pesquisadores, temos; infecções virais, obesidade materna e má-nutrição, bem como há riscos perinatais, como nascimento prematuro, baixo peso ao nascer, abuso de substâncias tóxicas como álcool e tabaco durante a gravidez (Atladótti et al., 2010; Atladóttir et al., 2012; Kong et al., 2012; Gardner et al., 2015; Atsem et al., 2016; Maeyama et al., 2018; Maher et al., 2018).

Um dos fatores ambientais mais relevantes no que diz respeito a prejuízos no neurodesenvolvimento é a própria hipóxia (Cannon et al., 2002; Xu et al., 2012; Giannopoulou et al., 2018; Roosterman e Cottrel, 2021; Brandon et al., 2022). Isso porque, apesar das células possuírem a capacidade de promover modificações adaptativas na maquinaria celular em resposta a baixas tensões de O<sub>2</sub> (Solaini et al., 2010; Semenza, 2012, Semenza, 2014; Fuhrmann e Brune, 2017) após longos e severos períodos de hipóxia, desregulam essa capacidade alterando a dinâmica e metabolismo das mitocôndrias, e conseqüentemente, o desenvolvimento do próprio sistema nervoso (Solaini et al., 2010; Phillips, 2016; Fuhrmann e Brune, 2017; Lee et al., 2020).

No sentido da hipótese do neurodesenvolvimento da SZ, os fatores ambientais, adjuntos a fatores genéticos, seriam eventos biologicamente ativos que alterariam a maquinaria, dinâmica e circuitaria do cérebro em desenvolvimento, gerando susceptibilidades e/ou vulnerabilidades que permaneceram latentes, funcionando como um gatilho, que seria disparado através da soma de outros fatores externos, ou outros eventos biologicamente ativos, como traumas psicossociais, abuso de drogas e álcool, entre outros, impulsionando os sintomas prodrômicos, e posteriormente, a SZ (Keshavan, 1999; Davis et al., 2014; Owen e O'Donovan, 2017; Patel et al., 2021).

O histórico da hipóxia na SZ está intrinsecamente relacionado com uma complicação obstétrica que causaria tais anormalidades, ou vulnerabilidades, na anatomia e dinâmica cerebral. Na prática clínica a hipóxia fetal se dá,



majoritariamente, em situações de hipertensão na gravidez, ou pré-eclâmpsia, causando uma redução da oxigenação do feto em desenvolvimento (Dalman et al., 1999; Murray et al., 2017; Tong e Giussani, 2019; Lahti-Pulkkinen et al., 2018; Poets, 2020; Robinson et al., 2021). No contexto multifatorial é importante mencionar que, um indivíduo que passou por situação de hipóxia fetal, não necessariamente vai desenvolver a SZ. Há possibilidade de a hipóxia alterar drasticamente a função celular não é um fator causal único. Porém, o surgimento da SZ dependerá se esse gatilho vai, ou não, ser disparado outro evento biologicamente ativo (Cannon et al., 2002; Xu et al., 2012; Giannopoulou et al., 2018; Roosterman e Cottrel, 2021; Robinson et al., 2021; Brandon et al., 2022).

Entretanto, a situação de hipóxia fetal promove uma chance duas vezes maior de o indivíduo desenvolver SZ (Hefter, 2018; Giannopoulou et al., 2018). Em relação a isso, foi evidenciado através de estudos com ressonância magnética, que pessoas que passaram por hipóxia fetal, possuem alterações na anatomia cerebral que são similares às daquelas observadas em indivíduos com o transtorno esquizofrênico e que também passaram pela mesma situação (Cannon et al., 2002).

Sabe-se que o cérebro fetal é altamente plástico e particularmente suscetível à hipóxia. Esta, inclusive, além de alterar a função mitocondrial, modifica também a expressão de centenas de outros genes tornando o ambiente do neurodesenvolvimento comprometido de diversas formas diferentes (Hefter et al., 2018). Por exemplo, Schmidt-Kastner e colaboradores em 2012 verificaram que 55% dos genes candidatos a serem relacionados com a SZ, são alterados pela hipóxia (Schmidt-Kastner, 2012). É importante ressaltar que, não apenas a SZ está ligada com eventos hipóxicos na gravidez, mas também diversos outros transtornos psicóticos e NDDs, como transtorno do espectro autista, déficit de atenção e hiperatividade, e o transtorno bipolar (Giannopoulou et al., 2018; Brandon et al., 2022).

Em relação a dopamina, foi evidenciado na substância negra e na área tegmental ventral – regiões relacionadas ao controle cognitivo e motor – de modelos animais de hipóxia fetal, uma alteração seletiva de longo prazo em neurônios dopaminérgicos que persistem na vida adulta, como diminuição de neurônios dopaminérgicos, na síntese e aumento de liberação de dopamina (Giannopoulou et al., 2018; Brandon et al., 2022). De forma interessante, a enzima

tirosina hidroxilase (TH), que converte a L-DOPA em dopamina, requer O<sub>2</sub> para seu funcionamento correto (Rostrup et al., 2008). Assim, a hipóxia pode ainda limitar a produção de dopamina no cérebro. Porém, para se adaptarem à hipóxia, o próprio HIF1 $\alpha$  aumenta a expressão de TH para compensar a redução de O<sub>2</sub> e propiciar o disparo dopaminérgico (Paulding et al., 2002; Giannopoulou et al., 2018).

Interessantemente, em amostras de cérebros *post-mortem* de neonatos humanos que passaram por hipóxia fetal, há a incidência de imunorreatividade da TH, na substância negra e na área tegmental ventral (Pagida et al., 2013). Em estudos de neuroimagem de pacientes com SZ, foi observado a mesma alteração (Howes et al., 2013). Nesse mesmo estudo conduzido por Pagida e colaboradores, com amostras humanas de neonatos que passaram por hipóxia fetal crônica, foi evidenciado uma redução da imunorreatividade da TH em neurônios mesencefálicos e uma redução do tamanho dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, demonstrando uma alteração precoce na neurotransmissão dopaminérgica sobre condições de hipóxia prolongada (Pagida et al., 2013).

Recentemente, Brandon e colaboradores em 2022, expuseram camundongos grávidos a uma situação de redução de oxigênio por 48 horas no período embrionário E10 até o E12, mimetizando uma situação de hipóxia fetal. Coletando o cérebro desses animais na sequência, foi observado uma diminuição dos progenitores dopaminérgicos, retardo na migração dos neurônios dopaminérgicos e diminuição de receptores de dopamina no mesencéfalo. Ainda, no décimo dia pós-natal, observaram uma diminuição na atividade da TH no estriado (Brandon et al., 2022). Esses achados demonstram que a hipóxia fetal pode sim ser um fator ambiental comprometedor ao cérebro em desenvolvimento, alterando, por exemplo, as funções de neurônios dopaminérgicos que se perpetuam durante a vida adulta.

Nesse contexto, a teoria de que alterações genéticas e/ou epigenéticas que predisõem à ocorrência e/ou determinariam uma maior sensibilidade a fatores ambientais precoces (por exemplo, complicações obstétricas, infecções perinatais) ganha importância. Essas alterações, por sua vez, causam alterações neurofisiológicas, tais como modificações na arborização neuronal, resposta dopaminérgica exacerbada e diminuição do volume de estruturas cerebrais (Murray et al., 2017). Corroborando tal hipótese, está o fato de que tais modificações tornariam os indivíduos mais vulneráveis para a ocorrência do primeiro episódio

psicótico, observado na fisiopatologia da SZ (Keshavan et al., 1999; Murray et al., 2017; Owen e O'Donovan, 2017; Patel et al., 2021). Por essa razão, modulação epigenética das Lys(k) deacetilases (KDACs), incluindo as sirtuínas (SIRTs) estão emergindo como potenciais alvos terapêuticos contra as NDDs (Rosenstock, 2013).

### **1.6 Modulação epigenética e neuroproteção**

O conceito de epigenética significa alterações na expressão de genes sem modificar as sequências de bases do DNA. Essas alterações podem ocorrer, por exemplo, em resposta aos fatores ambientais, resultando em alterações na forma em que a cromatina está tornando-se mais condensada ou mais frouxa, de uma forma mais ampla, a epigenética poderia ser resumida em “remodelação da cromatina” (Rosenstock, 2013; Naia e Rego., 2015; Naia et al., 2017a,b; Hwang e Song, 2017; Naia et al., 2021). Em consequência a isso, há a possibilidade de um gene, ou vários genes, serem mais ou menos expressos de acordo com o estímulo do ambiente.

Os nucleossomos são estruturas básicas da cromatina, constituídos de uma unidade do DNA genômico com aproximadamente 146 pares de bases, enroladas a um componente proteico, as histonas. Existem alguns tipos de histonas, como a histona 2 (H2), histona 2B (HB2), histona 3 (H3) e histona 4 (H4), todas possuem resíduos abundantes de lisina e arginina, e que favorecem um estado compacto e protegido assim modelando o formato da cromatina (Rosenstock, 2013; Hwang e Song, 2017). Nesse sentido, quando as histonas promovem um condensamento do DNA, controlando o acesso de outros fatores de transcrição. Assim, mecanismos epigenéticos que afrouxam essa condensação do DNA, fornecem uma importante regulação do genoma e da expressão gênica (Rosenstock, 2013; Hwang e Song, 2017).

Uma das formas de modulação epigenética é a própria modificação das histonas. Cada histona tem uma estrutura central, e diversas “caudas” de unidades amino (N-terminal), que contém aproximadamente mais de 100 unidades passíveis de serem alteradas pós-translacionalmente. Dentre essas modificações, podemos citar fosforilação, ubiquitinação, ribosilação do ADP, sumoilação, glicosilação, biotinação, metilação e acetilação (Rosenstock, 2013; Naia e Rego, 2015; Naia et al., 2017a,b; Hwang e Song, 2017; Naia et al., 2021). Nesse contexto, a metilação e a acetilação são as mais estudadas (Rosenstock, 2013). Sabe-se que há proteínas

chamadas de histonas acetilases (HATs), que mantêm os resíduos de lisina da cromatina acetilados, promovendo o afrouxamento da cromatina e o acesso para a transcrição gênica. Por outro lado, há as histonas deacetilases (HDACs), que removem esse grupo acetil, promovendo o condensamento e cessando a transcrição gênica (Rosenstock, 2013; Naia e Rego, 2015; Naia et al., 2017a,b; Hwang e Song, 2017; Naia et al., 2021).

A acetilação em resíduos de lisina das histonas foi uma das primeiras modificações a serem estudadas e são bem embasadas na literatura. Por conta disso, pode-se observar na literatura a troca da denominação de HATs ou HDACs, por lisina acetiltransferases (KATs) ou lisinas deacetilases (KDACs) (Rosenstock, 2013; Naia e Rego, 2015; Naia et al., 2017a,b; Hwang e Song, 2017; Naia et al., 2021). Existem diversas classes de HDACs (ou KDACs), sendo as classes I, II e IV denominadas de HDACs clássicas, e a classe III, conhecida como sirtuínas (SIRTs) (Rosenstock, 2013; Naia e Rego, 2015; Naia et al., 2017a,b; Hwang e Song, 2017; Naia et al., 2021).

As SIRTs, que compreendem 7 enzimas diferentes (SIRTs 1-7), são NAD<sup>+</sup>-dependentes, e estão relacionadas com diferentes mecanismos, como silenciamento gênico, reparação do DNA e regulação do metabolismo. As SIRTs 1, 6 e 7 são predominantemente nucleares, enquanto as SIRTs 3, 4 e 5 são importadas para as mitocôndrias, e a SIRT 2 é citoplasmática (Guarente, 2006; Rosenstock, 2013). De forma interessante, proteínas mitocondriais também são alvos da ação das SIRTs, o que resulta em uma regulação precisa do metabolismo. Por conta disso, a modificação via acetilação, modifica a transcrição de genes envolvidos em diversos processos mitocondriais alterando, conseqüentemente, a célula como um todo (Rosenstock, 2013; Naia e Rego, 2015; Naia et al., 2017a,b; Hwang e Song, 2017; Naia et al., 2021).

Apesar dos mecanismos moleculares por de trás dos efeitos benéficos das SIRTs ainda serem controversos, o papel delas na neuroproteção já vêm sendo descrito (Luthi-Carter et al, 2010; Gräff et al, 2013; Guedes e Oliveira, 2013; Naia e Rego, 2015; Singh et al, 2018; Naia et al., 2017a,b; Lloret e Beal, 2019). Sabe-se, por exemplo, que a SIRT3, a maior deacetilase localizada nas mitocôndrias (Naia e Rego, 2015; Naia et al., 2017a,b), auxilia no controle da fosforilação oxidativa mitocondrial e, conseqüentemente, regula a taxa da produção de ROS (Giralt et al, 2011). Curiosamente, a maioria dos sítios de acetilação reguladas pela SIRT3 são

enzimas envolvidas na via metabólica, o que faz da SIRT3 uma das principais reguladoras da função mitocondrial (Naia e Rego, 2015; Naia et al., 2017a,b).

No que diz respeito a esquizofrenia, moduladores de histonas deacetilases ganham destaque por possuírem uma eficiência antipsicótica, além de facilitar o aprendizado, memória e a neuroplasticidade sináptica (Rosenstock, 2013; Schroeder et al., 2016; Gilbert et al., 2019). Nesse sentido, a modulação das histonas pode vir a ser uma intervenção farmacológica em indivíduos susceptíveis para o desenvolvimento da SZ. De fato, existem evidências na literatura demonstrando uma diminuição na histona deacetilase 2 (HDAC2) no córtex dorsolateral frontal em amostras *post-mortem* de pacientes com SZ (Schroeder et al., 2016). Ainda, um estudo que utilizou a técnica de  $[^{11}\text{C}]\text{Martinostat positron emission tomography}$  (PET scan) usando pacientes com SZ, demonstrou que há uma redução de HDAC2 do próprio córtex dorsolateral, e isso foi relacionado aos prejuízos cognitivos dos pacientes (Gilbert et al., 2019). Em outro estudo, foi evidenciado alterações polimórficas, ou *single nucleotide polymorphism* (SNPs), nos genes das histonas deacetilases, o que poderia estar correlacionado com o aumento do risco para a SZ (Kim et al., 2010).

Ainda, outro estudo demonstrou que os níveis de acetilação de histona 3 resíduos de lisina 9 (H3K9) e resíduos de lisina 14 (H3K14) encontram-se diminuídos em regiões gênicas promotoras em 82 amostras *post-mortem* do córtex dorsolateral de pacientes com SZ (Akbarian et al., 2005). Não obstante, foi evidenciado em modelos animais que foram expostos a isolamento social (considerado fator ambiental psicossocial pós-natal nas NDDs), um aumento de marcas epigenéticas repressivas nas histonas, como a metilação da histona 3 resíduo de lisina 9 (H3K9) (Wilkinson et al., 2009; Focking et al., 2019). Portanto, isso reforça a ideia de que o disparo do gatilho, também pode ser realizado através de modificações epigenéticas, ou por fatores ambientais.

Portanto, como mostramos, alterações no neurodesenvolvimento estão relacionadas com a SZ e, também, sabemos que os fatores ambientais estão relacionados a modificações epigenéticas (Focking et al., 2019). Nesse sentido, insultos ambientais durante a gravidez são capazes de causar modificações epigenéticas e, conseqüentemente, alterar o neurodesenvolvimento (Bale et al., 2010; Monk et al., 2012; Focking et al., 2019). O comprometimento da gestação por insultos externos está associado a uma redução da acetilação (marcador de

promoção dos genes) e um aumento da metilação do DNA (marcador de repressão gênica) (Monk et al., 2012; Focking et al, 2019). Curiosamente a própria hipóxia é um promotor de metilação. Por meio do fator HIF1 $\alpha$ , a hipóxia é capaz de controlar os estados condensado ou descondensado da cromatina suprimindo genes que atuam em vias metabólicas na presença de O<sub>2</sub>, enquanto ativa genes que atuam na compensação metabólica visando garantir a homeostase energética celular durante esse período (Tsai e Wu, 2013; Ma, Xiong e Zhang, 2014; Batie, Peso e Rocha, 2018; Batie e Rocha, 2020; Kindrick e Mole, 2020; Kim et al., 2022). A hipóxia ainda, diminui a acetilação do resíduo de lisina 9 da histona 3, enquanto induz a sua metilação, uma marca ligada a repressão da transcrição genética (Tsai e Wu, 2013; Ma, Xiong e Zhang, 2014; Batie, Peso e Rocha, 2018; Batie e Rocha, 2020; Kindrick e Mole, 2020; Kim et al., 2022). Nesse sentido, alterações as causadas pela hipóxia podem influenciar diversas vias e, no escopo deste projeto, especificamente vias metabólicas mitocondriais, que poderiam ser, de fato, consideradas como um evento biologicamente ativo que causaria anormalidades no neurodesenvolvimento, ou um potencial gatilho para o surgimento do transtorno esquizofrênico.

Nesse contexto, em 2019 nosso grupo investigou o papel da hipóxia e da disfunção mitocondrial em astrócitos primários do córtex de animais controle (ratos Wistar) e de animais considerados modelos para SZ e hipóxia neonatal (ratos SHR) e observamos que, de fato, a hipóxia, tanto química, quanto neonatal, desregula o potencial de membrana mitocondrial, a homeostase de cálcio, aumenta os níveis de ROS e altera expressão de genes relacionados com a biogênese mitocondrial e defesas antioxidantes (E Silva et al., 2019). Portanto, investigar o papel da hipóxia sobre o metabolismo mitocondrial dos neurônios primários do córtex dos mesmos modelos é importante. Ainda, pelo fato de que as SIRT6s, que são histonas deacetilases, influenciarem na regulação de diversos fatores de transcrição e de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, faz-se necessário investigar o seu papel, também, na neuroproteção. Sendo assim, esse projeto visou investigar potenciais alvos terapêuticos contra prejuízos no neurodesenvolvimento causados pela hipóxia sobre a função mitocondrial.

## **1.7 Atividades realizadas no projeto**

A seguir, estão descritas todas as atividades relacionadas ao projeto do aluno Luiz Felipe Souza e Silva incluindo metodologia (concentrações de reagentes e/ou indicadores de fluorescência que foram utilizados nos experimentos), resultados, discussões e conclusões (todas atividades do projeto FAPESP 2018/13814-0). Também foram incluídos resultados referentes a continuidade do projeto FAPESP 2015/25595-2 (Mestrado). Isso porque apesar de não estarem presentes no projeto enviado ao ICB, eles dão continuidade aos resultados. São eles: teste de modulação das sirtuínas com os moduladores propostos, testes de viabilidade celular, função mitocondrial como, potencial de membrana mitocondrial, homeostase de cálcio, níveis de superóxido mitocondrial, e PCR em tempo real de genes envolvidos com a via da biogênese mitocondrial (*Pgc1 $\alpha$* , *Nrf1*, *Nfe2l2*, *Tfam* e *Tom20*), além da avaliação da quantidade de mitocôndrias por imunofluorescência. Todos os experimentos foram essenciais para as análises posteriores nos neurônios primários, pois com eles, conseguimos ter, por exemplo, um embasamento para as concentrações de reagentes que deveríamos utilizar para modular as sirtuínas e a hipóxia química, pontos cruciais ao projeto.

Nesse sentido, vamos apresentar esses dados na seção “resultados astrócitos”, e descreveremos na metodologia a quantidade de células utilizadas, concentrações de reagentes e o próprio método empregado para as análises. Ainda, é importante dizer que diversos dados chave, que serão apresentados na seção resultados astrócitos, já foram demonstrados em E Silva et al., 2019, como a modulação da hipóxia química, viabilidade perante essa situação e toda análise mitocondrial supracitada perante a própria situação de hipóxia química e neonatal. Portanto, sugerimos essa publicação como material complementar da tese (<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53605-4>). No mesmo sentido, todos os demais dados apresentados na seção “resultados astrócitos”, referentes a modulação de sirtuínas, e na seção “resultados neurônios” estão em processo de submissão. Nesse caso, nossas discussões serão voltadas para o que havíamos primariamente delineado para tais artigos e não apenas focadas exclusivamente nos resultados que apresentaremos.

No que diz respeito às análises de neurogênese e co-cultura, essas foram indubitavelmente afetadas pela pandemia. Nós não conseguimos realizar os experimentos propostos com a co-cultura e com as neuroesferas de neonatos a tempo de entregar a tese, entretanto, conseguimos padronizar ambas as culturas e

caracterizá-las, tanto para Wistar, quanto para SHR. Esses dados se encontram anexados à tese (ANEXO 1 e 2). Portanto, retiramos dos objetivos específicos a parte em que falávamos sobre as análises com neuroesferas.

Ainda, acrescentamos na seção ANEXOS dados de um projeto complementar que se originou a partir do projeto em questão, onde utilizamos um composto similar a um de nossos moduladores de sirtuínas *in vivo* a fim de verificar seus efeitos no comportamento animal (ANEXO 3). Também acrescentamos informações a respeito de um projeto de estágio no exterior que ocorreu em 2019 onde obtivemos alguns resultados que estão em pré-publicação (ANEXO 4).

## **1.8 Objetivos**

Avaliar o papel das SIRTs sobre a função mitocondrial e a neurogênese em diferentes modelos celulares de hipóxia: cultura primária de neurônios e astrócitos do córtex.

### **1.8.1 Objetivos secundários**

- Estabelecer um modelo celular *in vitro* de hipóxia química através do uso do Cloreto de Cobalto (CoCl<sub>2</sub>) em neurônios primários;
- Verificar os níveis e a expressão de HIF1 $\alpha$  (principal fator de transcrição relacionado com a via da hipóxia) após o tratamento com CoCl<sub>2</sub>;
- Avaliar a função mitocondrial nos modelos propostos antes e após a indução da hipóxia química;
- Determinar a função e a dinâmica neural em todos os tipos celulares após o tratamento de todos os grupos celulares com CoCl<sub>2</sub>;
- Averiguar o papel das SIRTs sobre as eventuais modificações na função mitocondrial ocasionadas pela hipóxia (em todos os grupos celulares de ambas as linhagens – Wistar e SHR);
- Analisar a modulação epigenética sobre os déficits mitocondriais impulsionados pela hipóxia e discutir, ao final do trabalho, sua importância e relevância para doenças do neurodesenvolvimento como a SZ.
-



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Dentre os materiais usados para efetuar os métodos descritos nessa seção temos os fluoróforos, Fluo-4-AM, Fluo-3-AM, Tetrametilrhodamina etil éster (TMRE), 2',7' - dichlorodihidrofluocescéina diacetato (H<sub>2</sub>DCF-DA), Pluronic® F127, Mitosox e Vybrant™ MTT proliferation Assay kit foram adquiridos da empresa *Molecular Probes/ Life/ThermoFisher (Eugene, OR, USA)*. Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Neurobasal, Soro Fetal Bovino, Antimicótico/Antibiótico (anti-anti) e Tripsina-EDTA 0.25%, foram adquiridos da empresa *Life/ThermoFisher (Waltham, Massachusetts, USA)*. Soro de albumina bovina (BSA), TRITON-X, Cloreto de Cobalto, Dimetilsulfóxido (DMSO), Dietilpirocarbonato (DEPC), Bicina, Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenil hidrazona (FCCP), Docetil Sulfato de sódio (SDS), Metanol e Polisorbato 20 (Tween-20) foram adquiridos da empresa *Sigma (St. Louis, Missouri, USA)*. Reagente Bradford Quick Start, PureZOL™, SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supemix, cDNA Synthesis Kit, Acrilamida, Sample Buffer (4x), Trypan Blue Stain e Membranas de PVDF foram adquiridos da empresa *BioRad (Hercules, California, USA)*. Clorofórmio e Isopropanol da empresa *Merck (Darmstadt, Alemanha)*. Os kits de avaliação de ATP, ADP, NAD<sup>+</sup>/NADH, Piruvato, Lactato e MDA foram adquiridos da empresa *Abcam (USA)*. Os anticorpos utilizados, bem como os primers estão descritos em suas respectivas seções.

Ainda, todos os procedimentos a seguir foram realizados nos laboratórios do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Parte dos experimentos, especificamente a avaliação dos astrócitos, foi realizada nos laboratórios da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, no Departamento de Ciências Fisiológicas.

### 2.1 Modelos animais

Foram utilizados ratos das linhagens Wistar e SHR (Ratos Espontaneamente Hipertensos), fornecidos pelo biotério central (responsável Dr<sup>a</sup> Zuleica Bruno Fortes), e mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Farmacologia (Unidade I). Os animais foram alojados em número de quatro, em gaiolas plásticas medindo 33 x 40 x 17 cm. Essas gaiolas foram mantidas com ventilação e temperatura de 20 a 23 °C, controladas por meio de aparelhos de ar-condicionado, em um ciclo claro-escuro de 12/12 horas, iniciando-se a fase clara às 06 horas 30 minutos. Água e comida foram fornecidas *ad libitum*. O método de acasalamento

para ambas as linhagens foi o sistema “harém”, onde duas fêmeas foram colocadas para acasalar com um macho.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos para o uso de animais de laboratório descritos pela Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e, também, de acordo com a lei Arouca, aprovada em 2008. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo sob o protocolo: 7646061120, e pela CEUA da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo sob o protocolo: 004/18, ambos sob a responsabilidade da orientadora Tatiana Rosado Rosenstock.

Para esse projeto, os animais Wistar foram utilizados como controle e os animais espontaneamente hipertensos (SHR) foram considerados modelos de hipóxia neonatal e esquizofrenia, seguindo os padrões técnicos da literatura.

### **2.1.1 Ratos espontaneamente hipertensos**

A linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é frequentemente usada para mimetizar a hipertensão gestacional (Pinto et al., 1998; Morton et al., 2019; Wang et al., 2021). A expressão anormal de proteínas placentárias e a desregulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, também são observadas em mães SHR (Mattace et al., 2008). Filhotes SHR apresentam as principais características observadas em humanos recém-nascidos quando expostos à hipertensão intra útero durante a gestação, como retardo de crescimento, prejuízo no neurodesenvolvimento e déficits cognitivos (Peraçoli et al., 2001; Bassan et al., 2005). Ainda, é importante mencionar que esses animais também são considerados modelos de SZ (Abílio et al., 2011; Calzavara et al., 2011; E Silva et al., 2019; Niigaki et al., 2019; Peres et al., 2018).

## **2.2. Grupos experimentais**

De modo a avaliar o metabolismo mitocondrial e a neurogênese, bem como o papel das SIRT6 frente à hipóxia nos modelos propostos, os experimentos foram realizados nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo CTR: células de animais Wistar;
- Grupo HIPÓXIA NEONATAL: células de animais SHR;

- Grupo HIPÓXIA QUÍMICA: células de animais Wistar expostas ao CoCl<sub>2</sub>;
- Grupo HIPÓXIA NEONATAL + QUÍMICA: células de animais SHR expostas ao CoCl<sub>2</sub>;
- Grupo CTR + SIRTs;
- Grupo HIPÓXIA NEONATAL + SIRTs;
- Grupo HIPÓXIA QUÍMICA + SIRTs;
- Grupo HIPÓXIA NEONATAL + QUÍMICA + SIRTs.

### 2.3 Cultura primária de astrócitos

Para a realização da cultura primária de astrócitos, utilizamos o córtex completo de ratos neonatos entre 3 e 4 dias de vida (p3-p4) como já descrito anteriormente (Rosenstock et al., 2004; Carvalho et al., 2004; E Silva et al., 2019). Inicialmente, o cérebro foi extraído e transferido para uma placa de petri contendo meio *dulbecco modified eagle medium* (DMEM) no gelo. Com uma lupa de dissecação (*cell zeiss microscopy stemi 305*), a meninge foi retirada por completo. O córtex foi dissecado e o tecido disperso mecanicamente com o auxílio de uma tesoura. Posteriormente, 3 agulhas de calibres distintos (24G x 3/4", 26G x 1/2", 30G x 1/2") foram utilizadas para a dissociação completa do tecido. A suspensão foi dispersa por 3x com cada uma das agulhas. Após o processo, a suspensão celular foi então centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* final foi ressuspensionado em 2 mililitros (ml) de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antimicótico/antibiótico (Anti-Anti). Após a ressuspensão, as células foram distribuídas em 2 frascos T75 cm<sup>2</sup>.

Para a realização da cultura, foi padronizado que para cada frasco de cultura T75 cm<sup>2</sup> seriam utilizados 3 hemisférios de córtex. Assim, 3 animais (6 hemisférios de córtex) seria suficiente para 2 frascos de cultura T75 cm<sup>2</sup> (Smaili e Russel, 1999; Rosenstock et al., 2004; Carvalho et al., 2004; E Silva et al., 2019). A cultura foi mantida a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C, e o meio foi trocado a cada quatro dias. Após a confluência desejada (90-95%), atingida após 12-13 dias em cultura, as células foram tripsinizadas.

Para a tripsinização, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas 3x com PBS 1x (PBS: mM: 0,14 NaCl, 2,7 KCl, 1,5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 8,1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Após o processo de lavagem, o PBS foi removido e foi adicionado 1,5 ml de tripsina-EDTA 0,25% por frasco T75 cm<sup>2</sup>; estes foram transferidos para uma estufa à 37 °C

por 5 minutos. Em seguida, a tripsina foi inativada com 1,5 ml de meio de cultura (contendo SFB 10%) e a suspensão final, contendo as células de interesse, foi transferida para um tubo cônico de 15 ml para serem novamente centrifugadas (2700 RPM por 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 5 ml de meio de cultura suplementado (DMEM suplementado). Em seguida, foi realizada a contagem utilizando a câmara de Neubauer. Obtemos, em média, 2-4 milhões de células a cada 1 ml. A partir disso, os astrócitos foram replaqueados de acordo com o objetivo dos experimentos. As densidades celulares que foram utilizadas são: para a *Multiwell* (MW) de 6 poços, 1.5 a  $1 \times 10^6$  células/poço; para a MW de 96 poços,  $6 \times 10^5$  células/poço (Rosenstock et al., 2004; Carvalho et al., 2004; E Silva et al., 2019). Após a aderência e maturação dos astrócitos, em média de 10-13 dias, as células foram utilizadas para os respectivos experimentos.

O processo de revestimento com Poli-L-Lisina (Ou Poli-D-Lisina) se iniciou 1 dia antes da cultura (E Silva et al., 2018). Brevemente, a solução estoque de Poli-L 1 mg/ml (ou Poli-D 0.1 mg/ml) foi adicionada às MW *overnight*. Para a MW6 foi utilizado 1 ml da solução, para as MW12 e 24, 500 microlitros ( $\mu$ L) são suficientes. O mesmo volume é utilizado quando se foi necessário revestir lamínulas de 13 milímetros (mm) para os procedimentos de imunofluorescência. Para a MW96 é necessário um volume de 100  $\mu$ l. Após a adição as placas foram deixadas na incubadora à 37 °C para a aderência da Poli-D (ou Poli-L). No dia seguinte, as placas foram lavadas 3x com água destilada e foram secas no fluxo laminar com exposição a luz ultravioleta (UV) por 30 minutos. Logo após, as placas foram utilizadas para a aderência dos astrócitos (e neurônios) primários ou seladas com parafilm e armazenadas na geladeira por um período máximo de 1 mês. Caso fosse observado alguma rachadura ou objeto estranho nas placas armazenadas, elas eram descartadas e novas placas revestidas eram feitas.

## **2.4 Cultura primária de neurônios**

Para a realização da cultura primária de neurônios, foi utilizado um protocolo adaptado de trabalhos já publicados na literatura (Naia et al., 2017a,b; Naia e Rego, 2018). Resumidamente, no décimo nono dia de gestação (E19) as fêmeas foram eutanasiadas e os embriões extraídos e alocados em uma placa de petri contendo meio *hank's balanced salt solution* (HBSS: mM: 140 NaCl, 0,5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0,4

MgSO<sub>4</sub>, 0,5 MgCl<sub>2</sub>, 0,3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 Glicose e 4 NaHCO<sub>3</sub>) em gelo. Após a extração do cérebro inteiro, o tecido foi transferido para outra placa de petri contendo HBSS gelado para a dissecação do córtex (*cell zeiss microscopy stemi 305*). O córtex extraído foi alocado em um tubo cônico de 50 ml contendo 5 ml de HBSS. O tecido foi dissociado quimicamente sendo exposto as soluções I, II, III e IV. A solução I constitui-se de *bovine serum albumin* (BSA) à 3% em 50 ml de HBSS. O BSA manterá o nível proteico das soluções seguintes. A solução II é a solução enzimática usada para dissociação do tecido que consiste em 7,5 mg de *trypsin from porcine pancreas* (0,02%) em 15 ml da solução I mais 80 µL de DNAse (stock 10 mg/ml). A solução III é a solução de inibição da tripsina, formada pela adição de 15 ml da solução I e contendo 11,25 mg (0,052%) de *soybean trypsin Inhibitor* mais 80 µL de DNAse (stock 10 mg/ml). A solução IV é uma solução de lavagem, constituída de 10 ml da solução I + 1,9 ml da solução III.

No processo de dissociação, o tecido foi exposto por 10 minutos na solução II à 37 °C. Após a exposição, foi adicionado à solução III e o tecido homogeneizado para inativar a ação da solução II. Após a homogeneização, as células foram centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Então, as células foram expostas à solução IV, homogeneizadas por completo e filtradas em um *cell strainer* (40 µM). O conteúdo foi novamente centrifugado a 1000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* celular foi ressuspendido em meio de crescimento que é constituído de neurobasal suplementado com gentamicina (50 µg/ml), B27 (2%) e glutamina (1,5 mM) e as células foram cultivadas diretamente em placas MW (revestidas com Poli-D, conforme descrito anteriormente) de acordo com o objetivo dos experimentos. O meio de cultura foi tocado a cada 4 dias. As densidades celulares que foram utilizadas são: para a MW de 6 poços, 2,5 x 10<sup>6</sup> células/poço; para a MW de 12 poços, 1,2 x 10<sup>5</sup> células/poço; para a MW de 96 poços, 8 x 10<sup>5</sup> células/poço (Naia et al., 2017a,b; Naia e Rego, 2018). Após a aderência e maturação dos neurônios, em média de 12-15 dias, as células foram utilizadas para os respectivos experimentos.

## 2.5 Caracterização dos modelos celulares

Para realizar a caracterização da cultura primária de neurônios e astrócitos dos animais Wistar e SHR, foram utilizadas duas técnicas distintas, imunofluorescência e citometria de fluxo (a citometria foi utilizada apenas para os

neurônios). Para os neurônios primários maduros, foi utilizado o anticorpo contra *microtubule-associated protein 2* (MAP2). Para verificar a caracterizar os astrócitos maduros, foi utilizado o anticorpo contra S100 $\beta$  (Sigma-S 2532).

### **2.5.1 Imunofluorescência**

Para realização da imunofluorescência, foram utilizados 10<sup>5</sup> neurônios, 2 x 10<sup>5</sup> astrócitos por lamínulas de 13 mm previamente revestidas conforme mencionado nos itens anteriores (Naia et al., 2017a,b; Naia e Rego, 2018; E Silva et al., 2018). Após o tempo descrito de cultivo *in vitro* de cada uma das culturas, o meio foi retirado e as células foram lavadas com 3x com PBS 1x e fixadas com paraformol (PFA) 4% por 10 minutos. Então, as lamínulas foram lavadas novamente por 3x com PBS 1x (5 minutos por lavagem) e permeabilizadas com 0.05% de Triton-X dissolvido em PBS 1X por 10 minutos. Em seguida, as lamínulas foram novamente lavadas por 3x com PBS 1x (5 minutos por lavagem) e bloqueadas com uma solução de BSA 3% + 0.01% de Triton-X dissolvido em PBS por 2 horas. Em todas as etapas as lamínulas estavam sob agitação leve (80 RPM).

Após o bloqueio, ocorreu a incubação com os anticorpos primários anti-MAP2 e anti-S100 $\beta$  na concentração de 1:500 *overnight*, todos foram diluídos na própria solução de bloqueio. No método utilizado para a incubação, as lamínulas foram posicionadas em uma placa de petri grande onde havia um parafilm™ esticado. Sob o parafilm foi colocado uma gota do anticorpo previamente dissolvido e sob a gota (30  $\mu$ L) foi, enfim, colocado a lamínula. Em volta das lamínulas em incubação, foi colocado algodões embebidos em água para manter a umidade. Logo após, essa caixa era transferida para a geladeira onde ficavam *overnight*. Nesse caso não havia agitação.

Na sequência da incubação, as lamínulas foram lavadas novamente 3x com PBS 1x (5 minutos por lavagem, sob agitação leve) e, depois, incubadas com os anticorpos secundários, *alexafuor 488* ou *594* (1:750) respectivos a espécie do primário e da cor desejada (verde ou vermelho) por 1 hora (sob agitação leve – 80 RPM). Os anticorpos secundários foram dissolvidos em PBS 1X. Após o tempo determinado, as células foram lavadas 3x com PBS 1x (5 minutos por lavagem) e então incubadas com DAPI na concentração de 1:10.000 dissolvido em PBS 1X para marcação do núcleo por 10 minutos (sob agitação leve). Por fim, as lâminas foram

novamente lavadas com PBS 1X (5 minutos por lavagem) e foram fechadas utilizando meio de montagem DAKO e lamínulas de vidro (Starfrost, 76x26 cm).

A leitura da fluorescência dos anticorpos foi realizada utilizando o microscópio de fluorescência *Leica DM2500 LED* (ou *Nikon digital câmera DXM 1200c*), e a contagem das células foi feita utilizando o software imageJ. Foram obtidas um total de 3 fotos por lamínula (fotografando 3 quadrantes distintos de cada lamínula). No total, foram 3 lamínulas de 3 *N*'s diferentes (9 fotos).

### **2.5.2 Citometria de fluxo**

O processo de citometria de fluxo foi realizado apenas para caracterização dos neurônios. Para tal, foram utilizados  $1.5 \times 10^6$  células para cada condição apresentada. O método (E Silva et al., 2018) consiste em realizar a tripsinização das células e transferi-las para 4 tubos de microcentrífuga, como se segue: tubo 1: apenas células fixadas com PFA 4%, tubo 2: células fixadas em PFA 4% expostas apenas ao anticorpo primário, tubo 3: células fixadas em PFA 4% expostas apenas ao anticorpo secundário, e tubo 4: células fixadas em PFA 4% incubadas com os anticorpos primário e secundário. O anticorpo primário foi o anti-NeuN, marcador do núcleo dos neurônios (1:250).

Para a fixação, todos os tubos contendo as suspensões celulares foram centrifugados (em todos os casos: 1000 RPM por 5 minutos). Na sequência o *pellet* foi ressuspendido em PBS 1x para lavagem. Após, as células foram centrifugadas novamente e o *pellet* ressuspendido em PFA 4% por 10 minutos (sob agitação leve 80 RPM). Depois, as células foram novamente centrifugadas e o *pellet* ressuspendido em PBS 1x para lavagem. No caso da condição do tubo 1, as células eram armazenadas em geladeira após esse processo. No caso das outras, elas foram centrifugadas novamente. Em sequência, as células foram ressuspendidas na solução de bloqueio (BSA 3% + 0.1% de Triton-x) e incubadas por 30 minutos sob agitação leve (80 RPM). Em seguida, as células foram novamente centrifugadas e o *pellet* ressuspendido na solução contendo o anticorpo primário (1:250) por 1 hora, sob agitação leve (80 RPM). Após, as células foram novamente centrifugadas e lavadas com PBS 1x. No caso, para a condição do tubo 2 as células foram armazenadas em geladeira (condição apenas anticorpo primário).

As células foram então são ressuspendidas na solução do anticorpo secundário respectivo a espécie do primário (*alexafuor 488* ou *594* - 1:500) por 1

hora, sob agitação leve (80 RPM). Para a condição do tubo 3 as células foram somente expostas ao secundário e, após o período de incubação, armazenadas em geladeira. Após o período, as células foram novamente centrifugadas e lavadas 3x com PBS 1x (uma centrifugação por lavagem) e por fim, armazenadas em PBS 1x até a leitura. Para a condição do tubo 4, foram feitas as incubações com o anticorpo primário e secundário.

A Leitura foi realizada no *BD FACSCalibur™* no laboratório multiusuário da Universidade Federal de São Paulo - INFAR utilizando o comprimento de onda (emissão e excitação) de acordo com o anticorpo secundário. Os resultados foram analisados pelo programa *Flowing Software 2.5.1*. Foram realizados 3 testes de citometria (N = 3) apenas para a caracterização.

## **2.6 Viabilidade celular frente à hipóxia química e moduladores de sirtuínas**

Após a caracterização das células, realizamos os testes de viabilidade celular frente à hipóxia química induzida por cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) (E Silva et al., 2019). O  $\text{CoCl}_2$  é conhecido como um indutor químico de hipóxia devido ao fato de bloquear a degradação do fator de transcrição HIF1 $\alpha$  levando, por conseguinte, ao aumento da ativação da cascata de hipóxia (Muñoz-Sánchez, 2019). O bloqueio da degradação se dá a partir da inibição das proteínas PHDs, que em uma situação de normoxia (concentrações normais de  $\text{O}_2$ ) promovem a hidroxilação do HIF1 $\alpha$  para sua posterior degradação (Muñoz-Sánchez, 2019). Para a utilização do  $\text{CoCl}_2$ , ele foi primeiramente dissolvido em água seguindo seus padrões físico-químicos, sendo aliquotado a 50 mM e armazenado no freezer  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  por um período máximo de 1 mês. As concentrações utilizadas para a indução da hipóxia química foram  $\text{CoCl}_2$  800  $\mu\text{M}$  que refletiria a hipóxia química moderada e  $\text{CoCl}_2$  2 mM refletiria a hipóxia química intensa, ambas por 24 horas, conforme trabalhos anteriores do grupo (E Silva et al., 2019).

Ainda, avaliamos a viabilidade das células frente aos moduladores de sirtuínas (SIRTs), Nicotinamida (NAM), Resveratrol (Rsv) e Sirtinol (Sir). Sabe-se que esses compostos têm a capacidade de inibir a ação das SIRTs (Naia e Rego., 2015; Naia et al., 2017a,b). Os moduladores foram dissolvidos em água seguindo seus padrões físico-químicos, sendo que o NAM foi aliquotado na concentração de 50 mM, o Rsv na concentração de 100  $\mu\text{M}$  e o Sir na concentração de 400  $\mu\text{M}$ . Todos foram armazenados no freezer  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  por um período máximo de 1 mês.



Os moduladores de SIRT foram testados em concentrações diversas, primariamente em astrócitos controle, como NAM (25, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$  e 1 mM), Rsv (0.25, 0.5, 1 e 2  $\mu\text{M}$ ) e Sir (2.5, 5, 10, 20 e 50  $\mu\text{M}$ ) por um período de 48 horas.

Para a análise da viabilidade, foi utilizado o teste do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium] (MTT) (Naia et al., 2017a,b; E Silva et al., 2018, 2019). O teste do MTT se baseia no fato de que células metabolicamente estáveis, que possuem desidrogenases mitocondriais ativas, clivam o anel tetrazólico do MTT e, por conseguinte, transformam o composto que é de coloração amarelada em um composto de coloração azul escuro, o formazan; este aparece na forma de cristais insolúveis em soluções aquosas. Com isso, a formação do formazan reflete a estabilidade do metabolismo da célula e, conseqüentemente, a sua viabilidade.

O teste de MTT foi realizado utilizando MW96 contendo  $8 \times 10^5$  neurônios por poço, e  $6 \times 10^5$  astrócitos por poço. Após a incubação com o  $\text{CoCl}_2$  e moduladores de SIRTs, o meio de cultura foi removido, os poços lavados com PBS 1x, e as células foram incubadas com o reagente MTT que foi dissolvido em meio KREBS (mM: 135 NaCl, 5 KCl, 0.4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgSO}_4$ , 20 HEPES, 5.5 glicose e pH 7.4) e utilizado na concentração final de 12 mM a 37 °C por 4 horas conforme descrito no *datasheet do kit vybrant MTT cell proliferation assay, Molecular Probes*. Para a dissolução dos cristais de formazan (roxos) formados devido a reação do MTT, foi removido 85  $\mu\text{L}$  do meio de cada poço e foi adicionado 50  $\mu\text{l}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) (*quick protocol – Vybrant Kit*). A solução foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta e as células incubadas novamente por 10 minutos a 37 °C. Após esse período, a suspensão celular foi homogeneizada até que os cristais se dissolvessem por completo.

Por fim, a placa de 96 foi transferida para o espectrofluorímetro de placa para a realização da leitura de absorbância a 540 nm a 37 °C (como foi designado pelo *datasheet* do fabricante). Quanto maior fosse o sinal de absorbância, maior a viabilidade das células. Da mesma forma, quanto menor sinal de absorbância, menor viabilidade. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão e normalizados, em porcentagem, para o respectivo grupo controle (*Untreated*). O número de experimentos por grupo foi de 3 amostras por grupo em duplicatas (N = 3, em duplicatas).

Com o intuito de observar se os moduladores conseguiriam proteger as células da redução de viabilidade causada pela hipóxia química nos neurônios e astrócitos, utilizamos o mesmo teste supracitado. Assim, foi realizado o tratamento prévio com os moduladores de SIRT6, por 24 horas. Nas 24 horas seguintes, as células foram expostas ao  $\text{CoCl}_2$  nas concentrações propostas. Totalizando um tratamento de 48 horas. Relembrando que as concentrações utilizadas foram 800  $\mu\text{M}$  e 2 mM de  $\text{CoCl}_2$  (24 horas) e dos moduladores foram NAM 50  $\mu\text{M}$ , Rsv 0.5  $\mu\text{M}$  e Sir 5  $\mu\text{M}$  (48 horas). Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão e normalizados, em porcentagem, para o respectivo grupo controle (*Untreated*). Número de experimentos por grupo foi de 3 amostras por grupo em duplicatas (N = 3, em duplicatas).

## 2.7 Verificação da ativação da hipóxia pelo $\text{CoCl}_2$

Para verificar se estávamos mimetizando a via da hipóxia após a exposição com  $\text{CoCl}_2$  (hipóxia química) nas duas concentrações propostas nos neurônios, analisamos por PCR em tempo real (qPCR) a expressão do *Hif1 $\alpha$*  e *vascular endothelial growth factor (Vegf)*, o mesmo método que utilizamos em E Silva et al., 2018 e 2019. Para tal, foram plaqueados  $2.5 \times 10^6$  neurônios por poço em uma MW6, que foram mantidas em cultura até a maturação completa dos neurônios. Após o período, o meio foi substituído e o tratamento com  $\text{CoCl}_2$  foi realizado (800  $\mu\text{M}$  e 2 mM) por 24 horas.

Logo depois do tempo de tratamento, as células foram lavadas 3x com PBS 1x e o RNA mensageiro (RNAm) foi extraído adicionando 1 ml de PureZOL (BioRad) por poço; foi seguido o protocolo de extração do fabricante. Para medição do RNAm foi utilizado o equipamento NanoDrop. Para as amostras de RNA, a razão A260/A280 foi, em média, 2,0.

Para a conversão do RNAm em DNA complementar (DNAc) foi utilizado 1  $\mu\text{g}$  de RNAm (previamente quantificado). Para isso utilizamos o kit *iScript cDNA Synthesis Kit* (Biorad) e seguimos o protocolo do fabricante. Em resumo, utilizamos 1  $\mu\text{g}$  de RNAm por amostra e adicionamos a elas, para um volume total de 20  $\mu\text{l}$ , o *master mix* contendo os reagentes *5x iScript reaction mix*, *iScript reverse transcriptase* e água ultrapura. Em seguida, as amostras foram colocadas em um termociclador onde aconteceu as etapas de *priming* por 5 minutos a 20 °C, *reverse transcriptase activation* 20 minutos por 46 °C e *reverse transcriptase inactivation* 1

minuto por 96 °C. Logo após, as amostras foram quantificadas no NanoDrop, diluídas em água ultrapura para 100 ng por µl e armazenadas em no freezer -20 °C até sua utilização.

Para o qPCR, foram utilizados 200 ng de DNAc, 300 nM de cada primer (*Forward e Reverse*) e 10 µL da enzima *universal SYBR®Green Supermix* (BioRad). O programa para a reação de qPCR em tempo real foi: 95 °C (ativação da enzima polimerase e desnaturação do DNA) por 30 segundos; 95 °C por 15 segundos (desnaturação do DNA), temperatura de *annealing* (que foi selecionada para cada primer) por 30 segundos, e o ciclo repetido por 45 vezes. Em ambos os casos a temperatura de *annealing* foi de 61 °C. A curva de *Melting* (65 °C até 95 °C) foi inserida no final de cada reação. O programa utilizado foi *7500 Applied biosystems* e a análise foi realizado no *7500 Applied Software V2.3*.

Em relação aos primers, segue a lista abaixo:

-*Hif1α*:o (5'-3'): GGTGGATATGTCTGGGTTGAG e (3'-5'): TTCAGCTGGTTTGAGGACAGA;

-*Vegf*: (5'-3'): ATCATGCGGATCAAACCTCACC e (3'-5'): GGTCTGGATTCACATCTGCTATGC.

Os dados foram ainda normalizados em relação a expressão do normalizador β-actina (5'-3': AGGGAAATCGTGCGGTGAC e 3'-5': CGCTCATTGCCGATAGTG) e representados em média ± desvio padrão e, normalizados em porcentagem, para o respectivo grupo controle (*Untreated*). Número de experimentos por grupo foi de 3 amostras por grupo em duplicatas (N = 3 em duplicatas).

## 2.8 Investigação da modificação epigenética por Western-Blot

Com o propósito de verificar se as concentrações e tempo de tratamento propostos nos testes de viabilidade com os moduladores de SIRTs (NAM, Rsv e Sir) causavam uma modificação epigenética, foi analisado via Western-blot, os níveis de acetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9ac) em relação aos níveis totais de histona 3 (Rosenstock, 2013; Naia et al., 2017a,b).

Para os astrócitos controle foram testadas as concentrações de NAM (25 e 50 µM), Rsv (0.25 e 0.5 µM) e Sir (2.5 e 5 µM). Para os astrócitos SHR e para os neurônios controle e SHR, foram testadas apenas as concentrações de NAM 50 µM, Rsv 0.5 µM e Sir 5 µM, em todos os casos o tratamento foi realizado por 48 horas.

Para a análise da acetilação, foi realizada a técnica de Western-Blot. Primeiramente, foram plaqueados  $1.5 \times 10^6$  astrócitos e  $2.5 \times 10^6$  neurônios por poço da MW6. Após o tempo de maturação, o meio foi substituído e foram realizados os tratamentos com os moduladores de SIRT6. Após 48 horas de incubação com os moduladores, foram realizados extratos totais conforme descrito anteriormente (Rosenstock et al., 2004; Rosenstock et al., 2010; E Silva et al., 2018, 2019; Siena et al., 2021). Resumidamente, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas 3x com PBS 1x e foi adicionado 100  $\mu$ L meio RIPA (mM: 150 NaCl, 50 Tris HCl – pH 7.4, 5 EGTA; contendo ainda 1% Triton, 0.5% DOC, 0.1% SDS) (pH 7.5) suplementado com MS-SAFE (inibidor de fosfatases e proteases). As células foram raspadas com auxílio de uma espátula estéril (*cell scraper*) e a suspensão obtida foi submetida a 3 ciclos de imersão no nitrogênio líquido e 3 ciclos de aquecimento em banho seco 37 °C (essa técnica favorece o rompimento das células e melhora a extração das proteínas). Após o ciclo de imersão, as amostras foram, também, submetidas ao banho sonicador por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C até sua utilização. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford utilizando o reagente *Bradford Quick Start* (BioRad) conforme o *datasheet* do fabricante.

A partir do extrato de proteínas iniciamos o processo de preparação das amostras para, logo após, realizarmos a corrida em gel de poliacrilamida (7.5-10%). As amostras foram preparadas utilizando 30  $\mu$ g de proteína e Sample Buffer 4-6x; logo após, elas foram aquecidas a 95 °C por 7 minutos para que ocorresse a desnaturação das estruturas quaternárias das proteínas. A eletroforese foi realizada por, aproximadamente, 1 hora 30 minutos a 120 mV com tampão de corrida (Tris 125 mM, Bicina 0.96 mM e SDS 0.5%). A transferência das proteínas foi realizada para membrana PVDF (0,2  $\mu$ M) previamente ativada com metanol puro; a transferência se deu por 2 horas, com amperagem constante de 320 mA (tampão de corrida e metanol 20% v/v). O método utilizado para a eletroforese foi previamente descrito (Rosenstock et al., 2004; Rosenstock et al., 2010; E Silva et al., 2018, 2019; Siena et al., 2021).

Após a transferência foi feito o bloqueio da membrana por 1 hora em leite Molico™ dissolvido em TBS-Tween (TBS-T) (nM: Tris 25, NaCl 150 e Tween-20 0.1%). A incubação com os anticorpos primários, diluídos em solução de bloqueio, se deu *overnight* a 4 °C. Foram utilizados anticorpos anti-acetil histona 3 (1:1000),

H3 total (1:1000), alfa-tubulina (1:5000; para normalização dos neurônios), e alfa-actina (1:5000; para normalização dos astrócitos). Após remoção do anticorpo primário, a membrana foi lavada 3 x com TBS-T, sendo cada lavagem de 10 minutos. Após a lavagem a membrana foi incubada com anticorpo secundário (específico para cada primário) por 2 horas à temperatura ambiente e protegida da luz (*HRP pAb goat to mouse IgG*, *HRP pAb goat to rabbit IgG*, *IgG rabbit anti goat* conjugado peroxidase; 1:8000).

Para a revelação da membrana, foi utilizado o reagente quimioluminescente *amersham ECL Prime* (GE Healthcare) ou *luminata forte western HRP Substrate* (Merck), e as imagens foram adquiridas no *genesys Immunoblotting system* (Syngene). A densidade óptica de proteínas de interesse foi obtida por intensidade/mm<sup>2</sup> e analisada pelo programa *quantity one* (BioRad). Os dados foram plotados em média ± desvio padrão a partir da normalização da densidade óptica da proteína de interesse em relação a histonas acetiladas e totais e ao grupo controle (em porcentagem). Número de experimentos por grupo, 3 amostras por grupo por 2x, ou seja, 2 géis (N = 3 em duplicatas).

## **2.9 Investigação do metabolismo mitocondrial – estudo funcional**

Para a análise do metabolismo mitocondrial foram utilizados diversos testes de espectrofluorimetria com diversos reagentes fluorimétricos, nomeadamente: Fluo-4-AM (astrócitos) e Fluo-3-AM (neurônios), ambos marcadores de cálcio citosólico, tetrametilrodamina ethil ester (TMRE) (indicador do potencial de membrana mitocondrial), e H<sub>2</sub>DCF-DA (DCF) e MITOSOX Red (indicador geral de espécies reativas de oxigênio e de superóxido mitocondrial, respectivamente). Em todos os experimentos foram utilizados 8 x 10<sup>5</sup> neurônios e 6 x 10<sup>5</sup> astrócitos, ambos em MW96.

Para os experimentos, foi realizado o tratamento prévio com os moduladores de SIRT por 24 horas. Nas 24 horas seguintes, as células foram expostas ao CoCl<sub>2</sub> nas concentrações propostas (800 µM e 2 mM), totalizando um tratamento de 48 horas. Vale dizer que havia condições sem tratamento (Wistar e SHR) e condições expostas apenas a hipóxia.

Os reagentes fluorimétricos Fluo-3-AM ou Fluo-4, TMRE e DCF foram incubados em meio de microscopia (mM: 120 NaCl, 3,5 KCl, 0,4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 NaSO<sub>4</sub>, 20 HEPES, 15 Glucose e pH 7.4), suplementado com cloreto

de cálcio 1 mM. Já para o experimento com Mitosox, as células foram incubadas em meio Krebs (mM: 132 NaCl, 4 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4 MgCl<sub>2</sub>, 6 Glucose, 10 HEPES) suplementado com cloreto de cálcio 1 mM. A leitura da cinética da fluorescência foi realizada em um espectrofluorímetro de placa (Spectramaxi3 e Spectramaxi2) por um período de 5 minutos (fluorescência basal) e por outros 5 minutos após adição de fluorocarbono-cianeto fenilhidrazina (FCCP) [5 µM], um protonóforo mitocondrial. O FCCP foi utilizado como controle interno experimental para obter a fluorescência máxima.

Para melhorar a visualização dos resultados, os gráficos dos experimentos de potencial de membrana mitocondrial (MMP) e cálcio citosólico demonstram apenas a condição Delta ( $\Delta$ ). A medida da fluorescência basal deu-se a partir da média dos últimos 10 pontos da leitura antes da adição do FCCP; por outro lado, a avaliação do  $\Delta$  foi obtida pela diferença da intensidade de fluorescência basal e da fluorescência após a adição do FCCP (média dos 10 últimos pontos após a adição do protonóforo). Nesse sentido, podemos observar o quanto as mitocôndrias foram capazes de sequestrar o TMRE e o quanto de Ca<sup>2+</sup> havia dentro das mitocôndrias.

No caso do DCF, foi demonstrado apenas a fluorescência basal, já que o nosso interesse era verificar os níveis gerais de ROS, independente se este estava sendo originado nas mitocôndrias. Especificamente em relação ao mitosox, demonstramos os dados referentes ao *slope* da curva normalizado por mg de proteínas. Nesse caso, os experimentos foram realizados medindo a cinética do fluoróforo ao longo de 1 hora e 30 minutos. Vale ressaltar que esses protocolos já foram previamente padronizados pelo nosso grupo e podem ser verificados em Rosenstock et al., 2004; Rosenstock et al., 2010; Naia et al., 2017a,b; E Silva et al., 2018, 2019; Siena et al., 2021 e Araújo et al., 2021.

### **2.9.1 Homeostase de cálcio**

Para averiguar a homeostase de Ca<sup>2+</sup>, as células foram incubadas por 1 hora a 37 °C com o reagente Fluo-4-AM na concentração de 10 µM no caso dos astrócitos, e Fluo-3-AM também na concentração de 10 µM no caso dos neurônios. O reagente foi preparado segundo as informações do *datasheet* do fabricante e de acordo com trabalhos anteriores do grupo (Rosenstock et al., 2004; Rosenstock et al., 2010; Naia et al., 2017a,b; E Silva et al., 2018, 2019, Araújo et al., 2021). Juntamente com o Fluo-3-AM (ou Fluo-4-AM) foi utilizado o Pluronic F-127™ (20%),

que é um detergente não iônico que facilita a entrada do *probe* nas células. O fluoróforo é comumente utilizado para marcar o cálcio citosólico, pois quando há a ligação dele com os íons de  $\text{Ca}^{2+}$  a molécula exibe um aumento de fluorescência quando excitada. Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação, 485 nm, e emissão, 525 nm. Como as mitocôndrias são responsáveis pela captura do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, após a exposição ao FCCP, veríamos um aumento do sinal fluorescente caso as organelas estivessem acumulando o íon. Esse método é um indicador, indireto, da capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial.

O resultado foi obtido em unidade de fluorescência (RFU) e os dados representados em média  $\pm$  desvio padrão em porcentagem em relação ao respectivo grupo controle (*Untreated*). Número de experimentos por grupo, 3 em duplicatas (N = 3, em duplicatas).

### **2.9.2 Potencial de membrana mitocondrial (TMRE)**

Para averiguar o potencial de membrana das mitocôndrias (MMP), as células foram incubadas por 1 hora a 37 °C com o reagente tetrametilrodamina ethil ester (TMRE) (500 nM). O reagente foi preparado segundo as informações do datasheet do fabricante e de acordo com trabalhos anteriores do grupo (Rosenstock et al., 2004; Rosenstock et al., 2010; Naia et al., 2017a,b; E Silva et al., 2018, 2019, Araújo et al., 2021). O TMRE é um indicador catiônico, potenciométrico, que é sequestrado preferencialmente por mitocôndrias energizadas, ou seja, com o potencial mais negativo. Nesse sentido, quanto maior o sinal do TMRE em condições basais, mais despolarizadas as mitocôndrias estão. Após a adição do FCCP, caso haja um aumento do sinal de fluorescência, significa que as mitocôndrias estavam polarizadas (por captarem o fluoróforo).

Os comprimentos de onda utilizados foram: excitação, 540 nm, e emissão, 590 nm. O resultado foi obtido em unidade de fluorescência (RFU) e os dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e normalizados, em porcentagem em relação ao respectivo grupo controle (*Untreated*). Número de experimentos por grupo, 3 em duplicatas (N = 3, em duplicatas).

### **2.9.3 Homeostase Redox**

Para averiguar a homeostase redox das células dois métodos distintos foram utilizados. Para avaliar os níveis de ROS gerais, foi usado o reagente diclohidro

fluoresceína carboxilada (CM-H<sub>2</sub>DCF-DA) na concentração de 20 µM. No caso dos neurônios, estes foram incubados por 2 horas e 30 minutos. O reagente foi preparado segundo as informações do *datasheet* do fabricante e de acordo com trabalhos anteriores do grupo (Rosenstock et al., 2004; Rosenstock et al., 2010; Naia et al., 2017a,b; E Silva et al., 2018, 2019, Araújo et al., 2021). O DCF é um reagente capaz de se difundir passivamente para o citosol das células e, em seu interior, seus grupos acetatos são clivados e a reação dos grupos clorometil tiol reativos com a glutathione e outros tióis intracelulares geram, então, a H<sub>2</sub>DCF, um produto fluorescente que fica retido no interior da célula. Assim, quanto maior o nível de espécies reativas de oxigênio dentro da célula, maior a intensidade de fluorescência. Os comprimentos de onda utilizados nesse experimento foram excitação, 495 nm e emissão 520 nm. O resultado foi obtido em unidade de fluorescência (RFU) e os dados representados em média ± desvio padrão e, em porcentagem em relação ao respectivo grupo controle (*Untreated*). Número de experimentos por grupo, 3 em duplicatas (N = 3, em duplicatas).

Para avaliar os níveis de superóxido mitocondrial foi utilizado o indicador mitosox, que quando oxidado pelo superóxido mitocondrial, produz uma fluorescência vermelha. O mitosox, contrariamente do DCF, é um indicador fluorescente considerado específico, uma vez que não é oxidado por outras espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio. Para a análise do sinal fluorescente desse indicador, as células (neurônios e astrócitos) foram incubadas com a concentração de 5 µM por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, foi realizada uma leitura de cinética por 1 hora e 30 minutos no espectrofluorímetro de placa. Os comprimentos de onda utilizados foram 510 nm de excitação e 580 nm de emissão. Ao fim da leitura, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x para, em seguida, serem incubadas com 20 µL de Triton-X 0.2% (por 30 minutos no gelo). Este processo se faz necessário para extração de proteínas das células no poço, com a finalidade de normalizar o *slope* da curva (leitura da fluorescência) por miligramas de proteínas de cada poço analisado. Os reagentes foram preparados segundo as informações do *datasheet* do fabricante e de acordo com adaptações dos trabalhos anteriores do grupo (Rosenstock et al., 2004; Rosenstock et al., 2010; Naia et al., 2017a,b; E Silva et al., 2018, 2019, Araújo et al., 2021).

As proteínas foram quantificadas pelo método Bradford, através do uso do reagente de *bradford quick start* (BioRad), que consiste na determinação da



concentração de proteína baseado na leitura da absorbância das amostras comparadas com a absorbância de uma curva padrão com concentrações conhecidas de BSA.

O resultado foi obtido em unidade de fluorescência (RFU), normalizados pelas mg de proteínas das respectivas amostras, representados em média  $\pm$  desvio padrão, e em porcentagem em relação ao respectivo grupo controle (*Untreated*). Número de experimentos por grupo, 3 em duplicatas (N = 3, em duplicatas).

### **2.9.3.1 Avaliação da peroxidação lipídica (MDA)**

Para a análise dos níveis de malondialdeído (MDA), um subproduto e indicativo da peroxidação lipídica, foi utilizado o um kit da Abcam denominado *lipid peroxidation (MDA) assay kit (colorimetric/fluorometric)* (Abcam - ab118970). O MDA presente na amostra reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA - reagente B) gerando um composto MDA-TBA que foi detectado fluorimetricamente (Ex/Em = 532/553 nm). Essa análise foi feita apenas para os neurônios e o método foi descrito previamente em E Silva et al., 2018, 2019. Para tal,  $2.5 \times 10^6$  neurônios foram plaqueados em MW6 e após os tratamentos (ou não) as células foram lisadas com o reagente A do kit (*buffer assay*). As amostras foram então centrifugadas a 13000 RPM por 10 minutos para retirar qualquer material proveniente da “lise”, e foram transferidas conforme descrito no *datasheet* do kit para uma MW96 preta. Em nossos experimentos foi utilizado a técnica fluorimétrica, que é capaz de detectar o composto MDA-TBA com uma concentração maior ou igual a 0.1 nmol/well. Os dados foram apresentados como MDA/nmol/ml e normalizados por mg de proteínas (MDA/nmol/ml/mg de proteínas). O resultado foi obtido em unidade de fluorescência (RFU), e os dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e normalizados em porcentagem em relação ao respectivo grupo controle (*Untreated*). Vale dizer que a análise foi realizada com a média das duas medidas de MDA, conforme descrito no *datasheet*. Número de experimentos por grupo, 3 em duplicatas (N = 3, em duplicatas).

### **2.9.4 Avaliação dos compostos altamente energéticos**

Para a análise dos compostos altamente energéticos, como ATP, Piruvato, Lactato, NAD<sup>+</sup> e NADH, foram utilizados os respectivos kits da empresa Abcam: *ATP assay kit (colorimetric/fluorometric – ab83355)*, *pyruvate assay kit*

(colorimetric/fluorometric – ab65342), L – lactate assay kit (fluorometric – ab65330) e NAD/NADH assay kit (colorimetric – A65348). Essas análises foram feitas apenas para os neurônios e o método foi descrito previamente em E Silva et al., 2018, 2019. Os dados com os astrócitos podem ser checados em E Silva et al., 2019.

Em todos os casos, foram plaqueados  $2.5 \times 10^6$  neurônios em poços da MW6, e as células foram expostas, ou não, a hipóxia e moduladores de SIRT6. No caso do ATP, o método se baseia na fosforilação do glicerol presente em um dos reagentes do kit, a fim de gerar um produto que pode ser facilmente quantificado fluorometricamente (Ex / Em = 535/587 nm). No caso do piruvato, ele é oxidado pela piruvato oxidase contida em um dos reagentes do kit, gerando a fluorescência que pode ser detectada (Ex / Em = 535/587 nm). Para o lactato, ele reage com os compostos do kit (não informado) gerando um produto que interage com a sonda (proveniente de um dos compostos do kit) produzindo fluorescência passível de ser detectada (Ex / Em = 535/587). Para o NAD<sup>+</sup>/NADH, o *NAD cycling enzyme* (composto do kit), gera uma reação ciclo enzimática aumentando significativamente a sensibilidade de detecção por absorbância do NAD<sup>+</sup> e NADH livres em momentos específicos indicados pelo *datasheet* dando base para o cálculo da razão (colorimétrico – OD 450 nm).

Em todos os casos, as amostras foram lisadas com o *buffer assay* proveniente de cada kit seguindo o protocolo do *datasheet*. Todas as leituras foram realizadas em placas pretas de 96 poços. Além disso, antes da montagem do experimento, as amostras foram desproteinizadas evitando a reação de enzimas presentes na própria amostra que poderia degradar tais compostos. Para o kit que mede NAD<sup>+</sup>/NADH, foi utilizado um *spin column* de 10 kb conforme solicitado no kit, onde as amostras foram centrifugadas a 14000 RPM por 10 min, então o residual é coletado e as amostras encontram-se sem proteínas.

Para o ATP, piruvato e lactato, foi utilizado um método de desproteíntização química descrito no *datasheet* onde as amostras foram expostas ao ácido tricloroacético 10% na razão 1:1 sob gelo por 5 minutos. O contato das proteínas com o ácido gera um composto ácido tricloroacético-proteínas que é passível de ser observado e, após a centrifugação (13000 RPM 10 minutos) o sobrenadante (amostra desproteíntizada) é retirado para outro tubo. Para neutralizar o pH das amostras foi utilizado o hidróxido de potássio (KOH) 0.1 M que foi adicionado às amostras na concentração de 30% em relação ao volume do sobrenadante após o

processo com o ácido. O KOH também ajuda a precipitar o excesso de ácido na amostra. Posteriormente, o pH foi analisado com uma fita de medição e deve estar entre 6,5 e 8. Posteriormente, as amostras foram novamente centrifugadas por 13000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo; essa amostra sem proteínas é que foi usada nas medições do kit.

Os resultados do ATP, piruvato e lactato foram obtidos em unidade de fluorescência (RFU), enquanto os resultados do NAD<sup>+</sup>/NADH foram obtidos em absorbância (OD: 540 nm). Em todos os casos os dados foram representados em média ± desvio padrão, e normalizados em porcentagem em relação ao respectivo grupo controle (*Untreated*). Número de experimentos por grupo, 3 em duplicatas (N = 3, em duplicatas). No caso das análises da razão NAD<sup>+</sup>/NADH foi utilizado a média das duas medidas, conforme descrito no *datasheet*.

### **2.9.5 Avaliação da função neural – Western-blot**

Para verificar se nossos tratamentos estavam alterando a função dos neurônios primários do córtex dos animais Wistar e SHR, nós avaliamos os níveis de: a sinaptofisina (*cell signaling* #5461; 1:1000), e a sinaptotagmina (*cell signaling* #14558; 1:1000), relacionadas a formação de vesículas sinápticas e sua liberação, respectivamente. Ainda, analisamos a proteína de densidade pós-sináptica 95 (PSD95) (*cell signaling* #2507; 1:250), que revela a quantidade de receptores pós-sinápticos.

Para verificar a via de poda neural (ou *pruning*), investigamos os níveis proteicos de semaforina 3A (Ab45376; 1:500) e plexina B1 (Ab2339; 1:250), um receptor e um ligante, respectivamente, responsáveis pelo processo de poda. O método utilizado foi o mesmo descrito na seção 2.8. Nesse caso, nós selecionamos um dos moduladores de SIRT, a Nicotinamida (NAM) para os experimentos, pois conforme nossos dados, o tratamento com esse composto apresentou melhores resultados. No mesmo sentido, expomos os neurônios apenas a situação de hipóxia intensa (CoCl<sub>2</sub> 2 mM), pois também causava maiores alterações na função mitocondrial das células. Da mesma forma, poderíamos ver se o NAM seria capaz de proteger as células expostas a hipóxia intensa.

Foram utilizadas 3 amostras por grupo em duplicatas na comparação entre Wistar e SHR sem tratamento (N = 3, em duplicatas). E foram utilizadas 3 a 4 amostras por grupo, com 2 géis, nas análises das amostras tratadas com o

modulador NAM e expostas a hipóxia química moderada (N = 3 e 4). Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão, e normalizados, em porcentagem, para o respectivo grupo controle (*Untreated*).

### **2.9.6 Investigação do metabolismo e dinâmica mitocondrial – PCR em tempo real**

Para o experimento de qPCR,  $2.5 \times 10^6$  neurônios e  $1.5 \times 10^6$  de astrócitos foram plaqueados em MW6. Após o tempo de maturação, o meio foi substituído e o tratamento com  $\text{CoCl}_2$  ou moduladores de SIRTs foi realizado. Após esse período, as células foram 3x lavadas com PBS 1x e o RNA mensageiro (RNAm) foi extraído utilizando 1 mL de PureZOL™ (BioRad), por poço; foi seguido o protocolo de extração do fabricante. A metodologia do qPCR pode ser checada na seção 2.7.

Basicamente avaliamos genes envolvidos com o processo de biogênese e metabolismo mitocondrial, através da medição da expressão do *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (*Pgc1 $\alpha$* ), *nuclear respiratory factor 1* (*Nrf1*) e *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (*Nfe2l2*). Ainda, analisamos o *transcription factor A, mitochondrial* (*Tfam*) e *translocase of outer mitochondrial membrane 20* (*Tom20*). O *Pgc1 $\alpha$*  é o fator é o regulador central da via de biogênese mitocondrial que impulsiona a transcrição de *Nrf1* e *Nfe2l2*. O *Nrf1*, por sua vez, fomenta a transcrição de componentes nucleares da ETC e o *Nfe2l2* induz a transcrição de genes envolvidos nos processos antioxidantes. Já o *Tfam* e o *Tom20* têm sua transcrição impulsionada também pelo *Nrf1* e *Nfe2l2* e são responsáveis, respectivamente, pela divisão do mtDNA, transcrição de componentes mitocondriais da ETC e pela expressão de translocadores de membrana externa mitocondrial para a importação dos componentes nucleares. O *Tom20* ainda é comumente utilizado para quantificar as mitocôndrias (Eliyahu et al., 2011;Wilde et al., 2017), pois é um dos mais importantes translocadores da OMM.

Analisamos ainda genes envolvidos na dinâmica de fissão e fusão mitocondrial, respectivamente *dynamin-related protein 1* (*Drp1*) e *mitochondrial fission 1* (*Fis1*) e *Mitofusin-2* (*Mfn2*). O *Drp1* e o *Fis1* funcionam como ligante e receptor para a via da fissão das mitocôndrias. Já o *Mfn2* é uma proteína da via da fusão mitocondrial, que só é ativada após a ligação da OMM com a IMM de duas mitocôndrias.

Para o cálculo do  $\Delta\Delta CT$  os CT das amostras foram normalizados pelo CT do gene *housekeeping* beta-actina, conforme descrito na seção 2.7. Entretanto, no caso dos astrócitos, foi realizada a análise pela expressão relativa, que se dá pela normalização do CT do gene alvo da amostra tratada, pelo CT do gene alvo da amostra controle, isso porque a hipóxia alterava todos os genes *housekeeping* que testamos para esse tipo celular (E Silva et al., 2018).

Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão e normalizados, em porcentagem em relação ao respectivo grupo controle (*Untreated*). Número de experimentos por grupo, 3 em duplicatas (N = 3, em duplicatas).

A sequência de primers utilizados segue abaixo:

Para o *Pgc1 $\alpha$*  a sequência de primers foi 5'-3': CTGCACACGGAGAGTTAAAGG e 3'-5': TAACTGAGCTACCCTTGGG.

Para o *Nrf1* 5'-3': GCTAAGGCTGCTGGGAAGTA e 3'-5': TCAGTTGCTGTGGCGAGTTA.

Para o *Nfe2l2*: CTGCTGCCATTAGTCAGTCG e 3'-5': GTGCCTTCAGTGTGCTTCTG.

Para o *Tfam* 5'-3': CAGAGTTGTCATTGGGATTGG e 3'-5': CATTCAAGTGGGCAGAAAGTCC.

Para o *Tom20* 5'-3': GAGCTGGGCTTTCCAAGTTA e 3'-5': TGTTGGTGTCTGGCTCATTC.

Para o *Drp1* 5'-3': GAGAACTACCTTCCGCTGTATC e 3'-5': CCTCACAATCTCGCTGTTCT.

Para o *Fis1* 5'-3': CATGGATGCCAAGAGATGAA e 3'-5': GGGCCAGGTAGAAGACATAATC.

Para o *Mfn2* 5'-3': CCAGCCAGAGCAAAGTAAGA e 3'-5': GCACAATCCAGTCCAGAGAA.

Para a  $\beta$ -actina foi 5'-3': AGGGAAATCGTGCGGTGAC e 3'-5': CGCTCATTGCCGATAGTG.

### **2.9.7 Análise da quantidade de mitocôndrias**

Para a análise da quantidade de mitocôndrias, foi utilizado o reagente *mitotracker deep red* (MTDR). Essa análise foi realizada apenas com os astrócitos. Para isso,  $15 \times 10^5$  astrócitos foram plaqueados em lâminas de 13 mm previamente revestidas com Poli-L-lisina (1 mg/ml).

Para a quantificação, do MTDR, as células foram incubadas com 500 nM do indicador por 1 hora a 37 °C em meio de Krebs (Wiemerslage e Lee, 2016). Posteriormente o meio foi removido e as células foram fixadas com PFA 4% por 10 minutos. Na sequência, as lamínulas foram lavadas 3x com PBS 1x, e foram permeabilizadas por 10 minutos com uma solução contendo 0.01% de Triton-X em PBS 1x. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 3x com PBS 1x e o bloqueio foi realizado com BSA a 3% em PBS por 1 hora. Em seguida, as células foram incubadas *overnight* em uma solução de bloqueio com o anticorpo S100 $\beta$  Sigma-S2532 (1:500) para marcar os astrócitos.

No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas 3x com PBS 1x e incubadas com um anticorpo secundário, *alexafluor 488* (verde) (1:750). Em seguida, foram lavados (3x com PBS 1x) e incubados com DAPI (1:10.000) por 10 minutos. Após o processo, as lamínulas foram lavadas novamente (3x com PBS 1x) e fechadas em lâminas Starfrost (26x76 mm) e a leitura da fluorescência foi realizada em microscópio de fluorescência *Nikon digital camera DXM 1200c*.

A análise do número de mitocôndrias foi realizada usando o software ImageJ (Wiemerslage e Lee, 2016). Para isso, foram feitas 4 fotos de 8 lamínulas (4 quadrantes diferentes de cada) dos astrócitos Wistar e SHR. No total, foram selecionadas 8 fotos de cada grupo experimental (N = 8).

O método de análise foi adaptado do protocolo existente (Wiemerslage e Lee, 2016) onde a quantificação foi realizada utilizando o *threshold* da fluorescência vermelha do MTDR por sua intensidade total de fluorescência, e normalizado pelo número de células de cada foto. A quantificação se deu em área/pixels/células. Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão e normalizados, em porcentagem em relação ao grupo controle (*Untreated*).

### **2.9.8 Análise estatística**

Todos os resultados obtidos e aqui apresentados foram analisados com o Teste T de *student* (para a comparação entre dois grupos experimentais distintos) ou One-way ANOVA, para análise de variância, seguido de diferentes testes post-hoc de Tukey. A probabilidade de  $p < 0.05$  foi considerada significativamente diferente para todas as comparações realizadas.

### **3 RESULTADOS**

Nessa seção descrevemos os resultados obtidos com a cultura primária de astrócitos do córtex e cultura primária de neurônios do córtex de animais Wistar e SHR. No final desta seção, há uma tabela com o resumo dos resultados para facilitar a compreensão dos dados e ajudar no “passo a passo” da discussão.

Vale ressaltar que, no caso dos astrócitos, as comparações entre Wistar e SHR sem tratamento foram demonstradas em E Silva et al., 2019. Os efeitos da hipóxia química *per se* nos astrócitos também foram previamente demonstrados em E Silva et al., 2019. Portanto, nessa seção, mostraremos os efeitos dos moduladores de SIRT6 sobre a hipóxia.

### **3.1 Resultados Astrócitos**

Nessa seção demonstraremos as diferenças entre os astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR (modelo de hipóxia neonatal) e, também, os resultados obtidos após a exposição à hipóxia química e o tratamento prévio com os moduladores de SIRT6.

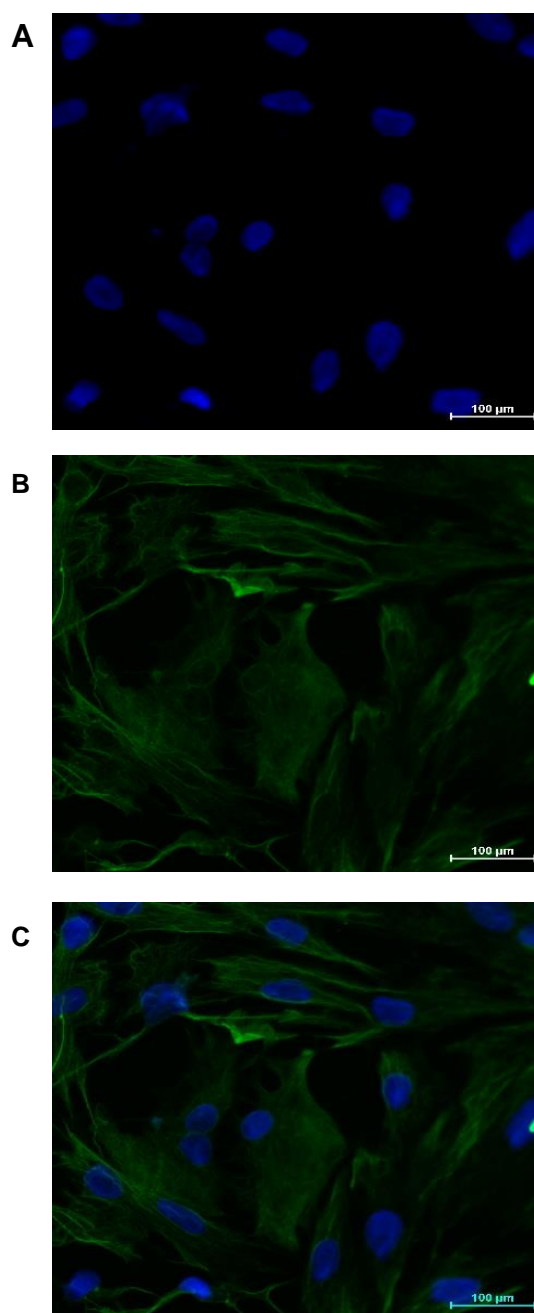
#### **3.1.1 Caracterização da cultura primária de astrócitos - Imunofluorescência**

Antes de iniciarmos nossos experimentos funcionais, realizamos uma caracterização da cultura primária de astrócitos para que tivéssemos certeza do tipo celular a ser avaliado.

Como podemos observar na figura 2 e 3, nossos resultados demonstram que aproximadamente 100% das células coradas com DAPI estavam positivas para S100 $\beta$ . Vale mencionar que nossa cultura de astrócitos já havia sido caracterizada anteriormente por outros métodos, como citometria de fluxo, e usando também outros anticorpos, como o *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Esses dados estão presentes na tese de mestrado (E Silva et al., 2018). Entretanto, como o GFAP também pode marcar neurônios imaturos, passamos a usar o anticorpo para o S100 $\beta$  como método complementar. O S100 $\beta$  marca as proteínas de ligação de cálcio beta dos astrócitos, proteína altamente expressa nessas células em seu estágio maduro (Raponi et al., 2007; Brozzi et al., 2009, Du et al., 2021).

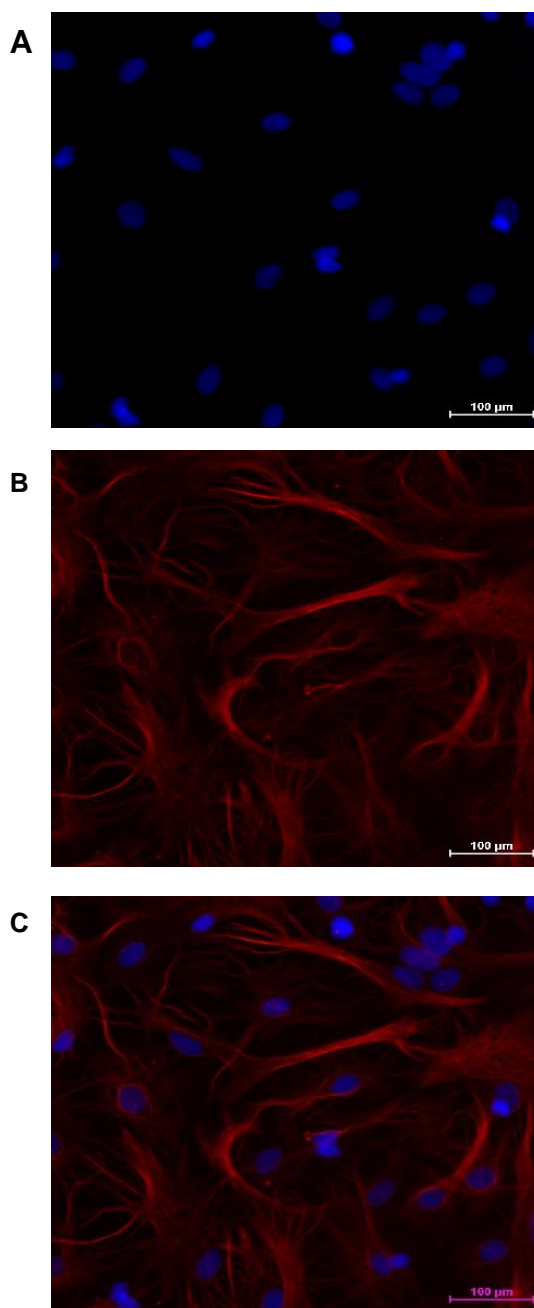


**Figura 2:** Imunomarcção representativa da caracterização dos astrócitos primários do córtex de animais Wistar



**Legenda:** Imunofluorescência foi realizada com anticorpo S100 $\beta$  para marcação de astrócitos maduros 1:500 (verde) e DAPI para a marcação do núcleo celular 1:10.000 (azul). Imagens adquiridas com a objetiva de 20x (escala de 100  $\mu$ M). (A) Representação da imunofluorescência com DAPI, (B) Representação da imunofluorescência com S100 $\beta$ , e (C) Representação do *merge* entre o DAPI e o S100 $\beta$ .

**Figura 3:** Imunomarcção representativa da caracterização dos astrócitos primários do córtex de animais SHR



**Legenda:** Imunofluorescência foi realizada com anticorpo S100 $\beta$  para marcação de astrócitos maduros 1:5000 (verde) e DAPI para a marcação do núcleo celular 1:10.000 (azul). Imagens adquiridas com a objetiva de 20x (escala de 100  $\mu$ M). (A) Representação da imunofluorescência com DAPI, (B) Representação da imunofluorescência com S100 $\beta$ , e (C) Representação do *merge* entre o DAPI e o S100 $\beta$ .

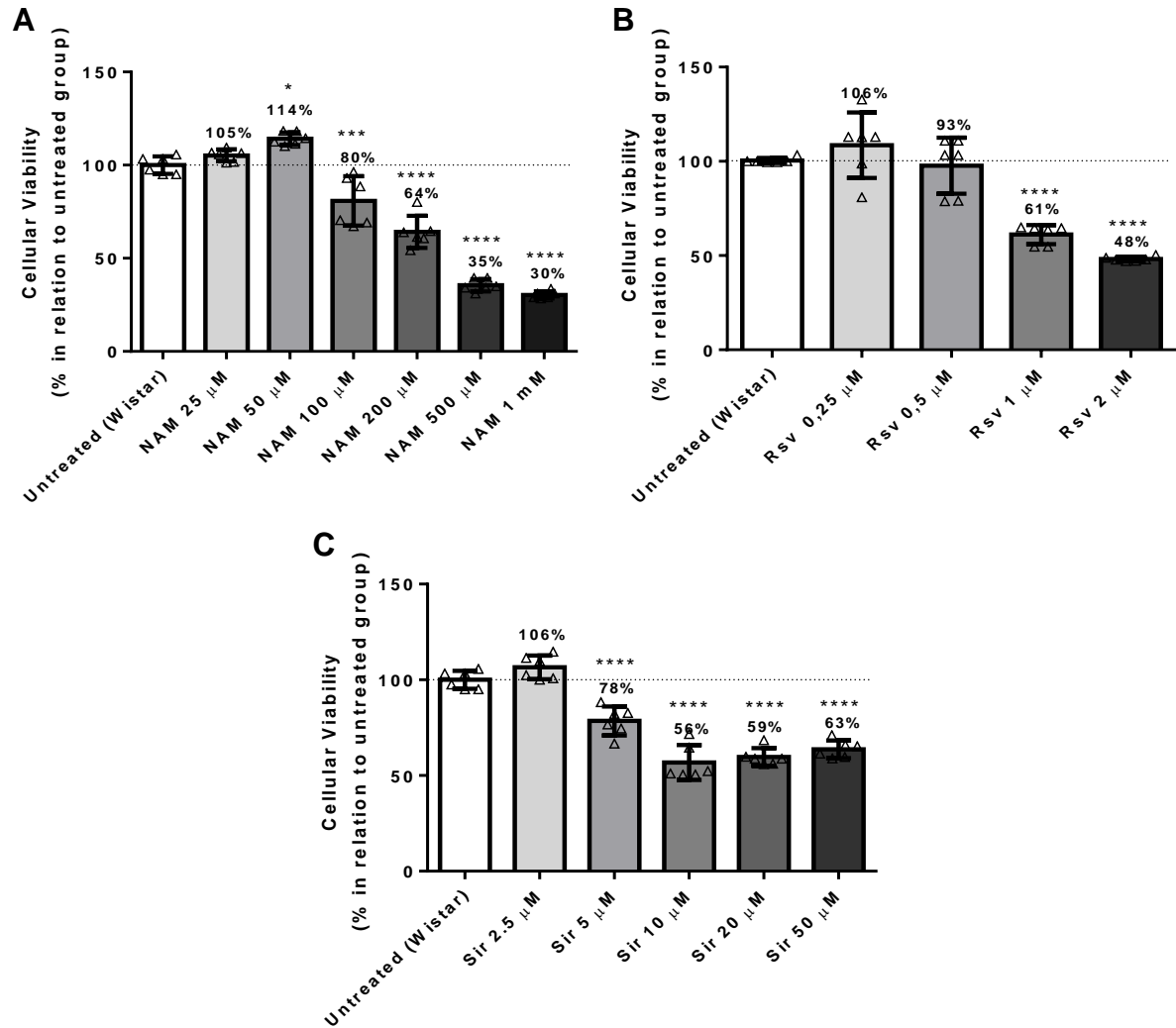
### **3.1.2 Viabilidade frente aos moduladores de sirtuínas**

Antes de iniciarmos os testes com os moduladores de sirtuínas testamos a viabilidade dos astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR frente ao estímulo com os moduladores. Nesse caso, foram testadas diversas concentrações de NAM (25, 50, 100, 200, 500  $\mu\text{M}$  e 1 mM), Rsv (0.25, 0.5, 1 e 2  $\mu\text{M}$ ) e de Sir (2.5, 5, 10, 20 e 50  $\mu\text{M}$ ) por um período de 48 horas. Pode-se observar que as concentrações de NAM 25 e 50  $\mu\text{M}$  mantiveram as células viáveis, sendo que a concentração de 50  $\mu\text{M}$  aumentou a viabilidade dos astrócitos em 14% em comparação com o grupo controle (Figura 4 A). As concentrações de NAM 100, 200, 500  $\mu\text{M}$  e 1 mM reduzem significativamente a viabilidade dos astrócitos controle (Wistar) em 20, 36, 65 e 60%, respectivamente (Figura 4 A).

No caso do Rsv as concentrações de 0.25 e 5  $\mu\text{M}$  não alteram a viabilidade dos astrócitos Wistar (Figura 4 B). Entretanto, as concentrações de 1 e 2  $\mu\text{M}$  diminuem de forma significativa a viabilidade dos astrócitos controle em 39 e 42%, respectivamente (Figura 4 B). No caso do Sir, o tratamento com a concentração de 2.5  $\mu\text{M}$  não altera de forma significativa a viabilidade dos astrócitos controle (Figura 4 C). Porém, as concentrações de 5, 10, 20 e 50  $\mu\text{M}$  reduzem significativamente a viabilidade dos astrócitos em 22, 44, 41 e 37% (Figura 4 C).

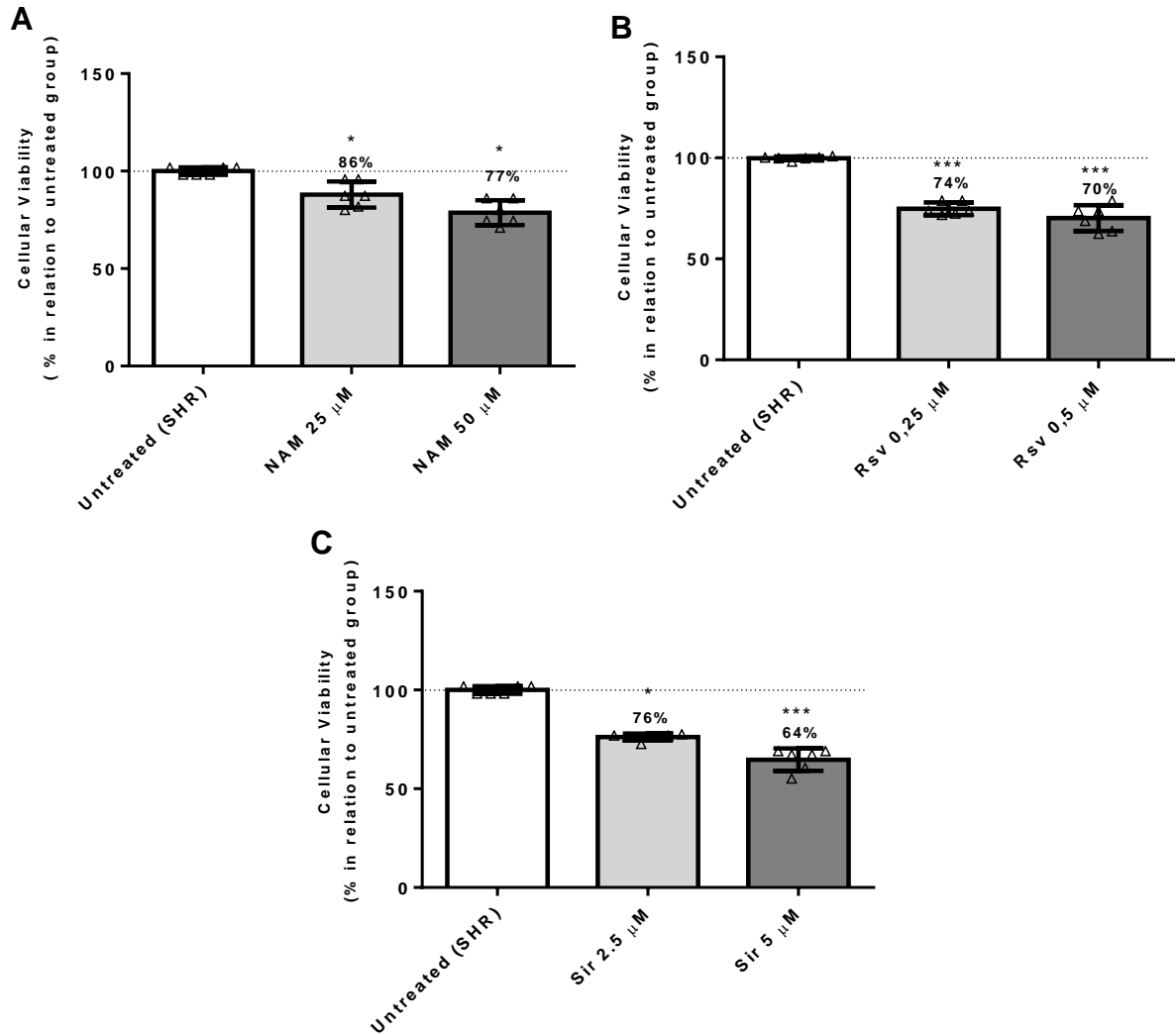
Como observamos que nos astrócitos controle (Wistar) as concentrações maiores dos compostos moduladores de sirtuínas causavam uma redução intensa da viabilidade celular, nos astrócitos primários do córtex de animais SHR testamos apenas as concentrações mais baixas, NAM 25 e 50  $\mu\text{M}$ , Rsv 0.25 e 0.5  $\mu\text{M}$  e Sir 2.5 e 5  $\mu\text{M}$ . Na figura 5 A observa-se que o tratamento com NAM por 48 horas nas concentrações propostas reduz de forma significativa a viabilidade dos astrócitos primários do córtex de animais SHR em 14 e 23%, respectivamente (Figura 5 A). No caso do Rsv o tratamento com 0.25 e 0.5  $\mu\text{M}$  reduziu a viabilidade significativamente em 26 e 30%, respectivamente (Figura 5 B). No caso do tratamento com o modulador Sir, houve uma redução de 24 e 36%, respectivamente (Figura 5 C). Com base nos dados obtidos nas análises decidimos usar as duas menores concentrações dos moduladores de SIRTs para a análise da modulação.

**Figura 4:** Viabilidade celular dos astrócitos primários do córtex dos animais Wistar frente ao tratamento com os moduladores de SIRT1 (NAM, Rsv e Sir) por 48 horas



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Nicotinamida (NAM) nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 500  $\mu$ M e 1 mM. (B) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Resveratrol (Rsv) nas concentrações de 0.25, 0.5, 1 e 2  $\mu$ M. (C) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Sir nas concentrações de 2.5, 5, 10, 20 e 50  $\mu$ M (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao grupo sem tratamento.

**Figura 5:** Viabilidade celular dos astrócitos primários do córtex dos animais SHR frente ao tratamento com os moduladores de SIRT1 (NAM, Rsv e Sir) por 48 horas



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Nicotinamida (NAM) nas concentrações de 25 e 50  $\mu$ M. (B) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Resveratrol (Rsv) nas concentrações de 0.25 e 0.5  $\mu$ M. (C) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Sir nas concentrações de 2.5 e 5  $\mu$ M (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao grupo sem tratamento.

### **3.1.3 Viabilidade celular: Hipóxia química versus moduladores de sirtuínas**

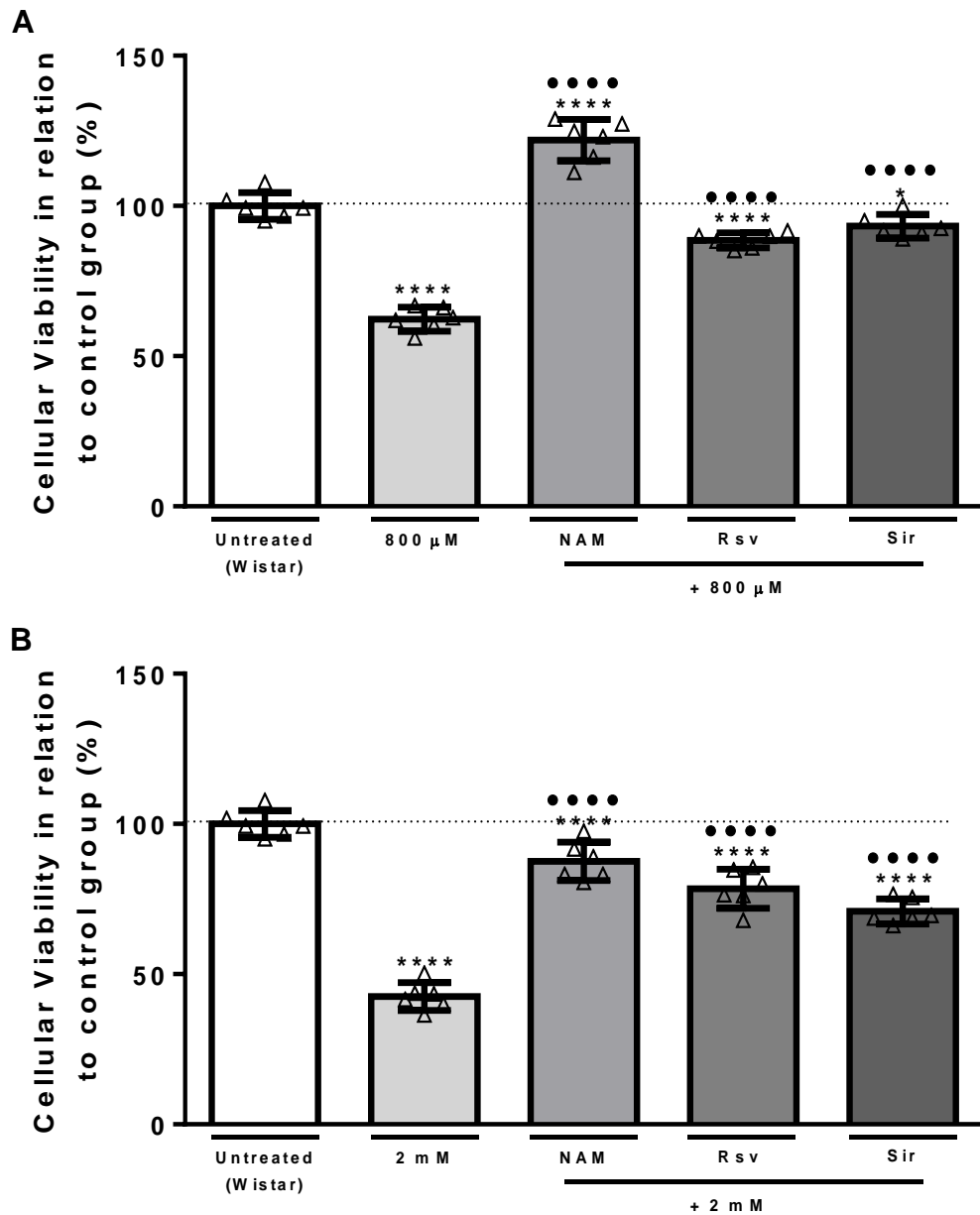
Com o intuito de observar se os moduladores conseguiram amenizar a redução de viabilidade causada pela hipóxia nos astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR, foi realizado o tratamento prévio com NAM (50  $\mu\text{M}$ ), Rsv (0.5  $\mu\text{M}$ ) e Sir (2.5  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas. Após as primeiras 24 horas, as células foram expostas a hipóxia química ( $\text{CoCl}_2$ ) nas concentrações de 800  $\mu\text{M}$  e 2 mM,

Podemos observar que a situação de hipóxia química moderada reduz em 40% a viabilidade dos astrócitos controle (Figura 6 A). Já a hipóxia química intensa causa uma redução de 58% da viabilidade dos astrócitos controle (Figura 6 B). Porém, quando as células foram previamente tratadas com os moduladores de SIRTs e expostas a hipóxia química moderada (800  $\mu\text{M}$ ) houve um aumento da viabilidade celular em todos os casos em relação ao grupo exposto somente à hipóxia. No entanto, o tratamento com NAM 50  $\mu\text{M}$  não só protegeu as células da hipóxia química moderada, como aumentou a viabilidade em 21% em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*).

No caso da exposição à hipóxia química intensa, novamente, todos os moduladores de SIRTs foram capazes de proteger as células da redução de viabilidade (Figura 6 B). Nos dois casos, temos um efeito protetor dos moduladores de SIRTs frente à hipóxia.

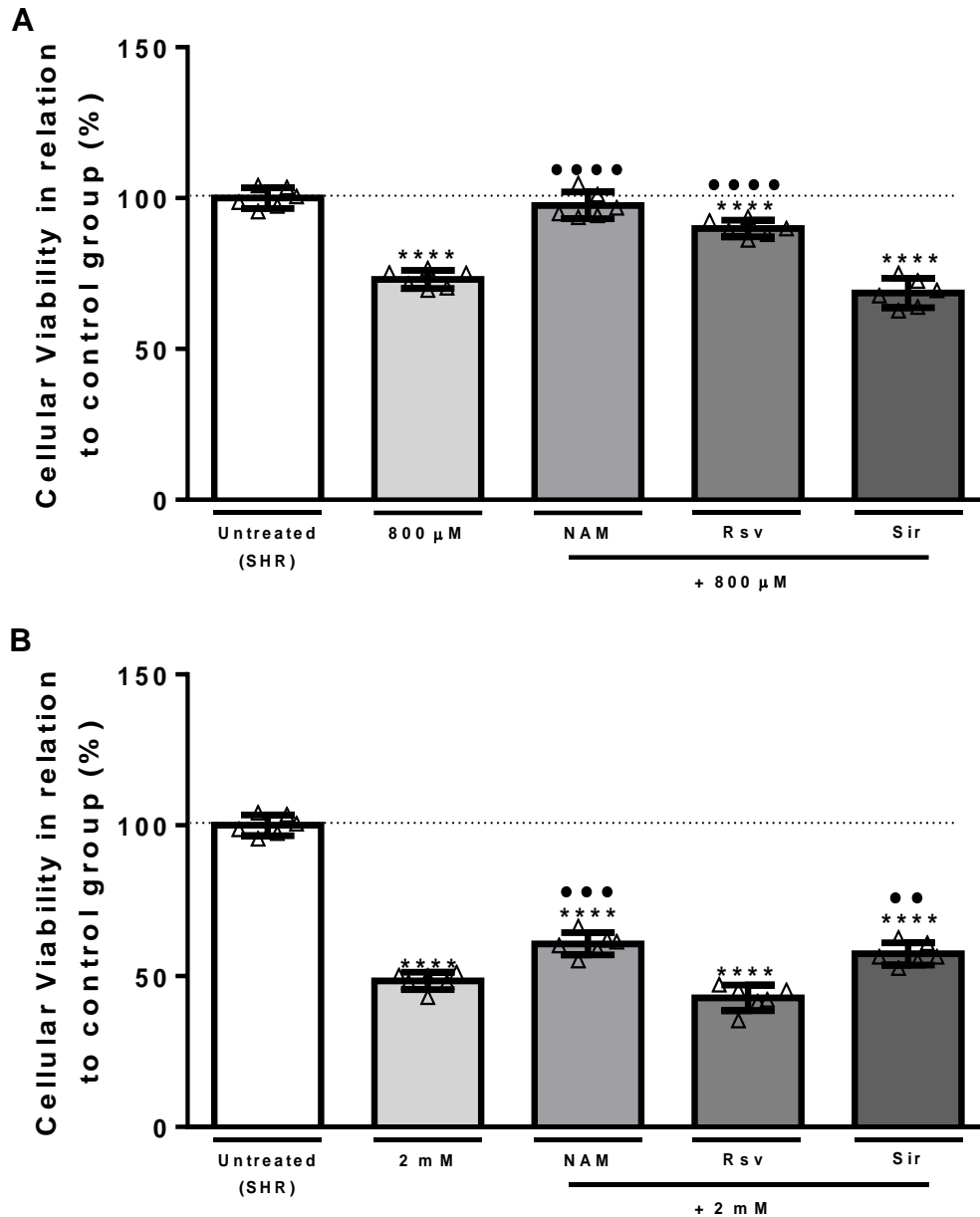
No caso dos astrócitos primários do córtex de animais SHR, podemos observar que a hipóxia moderada (800  $\mu\text{M}$ ) reduz a viabilidade celular em 27% (Figura 7 A). Já a hipóxia química intensa causa uma redução de 52% (Figura 7 B). Entretanto, os tratamentos prévios com os moduladores NAM (50  $\mu\text{M}$ ) e Rsv (0.5  $\mu\text{M}$ ) foram capazes de proteger os astrócitos SHR dos efeitos da hipóxia química moderada (800  $\mu\text{M}$ ), mas não restabeleceram a viabilidade a níveis basais. Já o tratamento prévio com Sir não foi capaz de aumentar a viabilidade dos astrócitos SHR (Figura 7 A). Na condição de hipóxia química intensa, apenas o NAM e Sir foram capazes de proteger as células contra a hipóxia (Figura 7 B). Os dados observados nas análises com os astrócitos Wistar e SHR demonstram uma capacidade dos moduladores de SIRTs em proteger as células dos efeitos da hipóxia química.

**Figura 6:** Viabilidade celular dos astrócitos primários do córtex dos animais Wistar frente ao tratamento prévio com moduladores de SIRT1 por 48 horas e exposição a hipóxia química por 24 horas



**Legenda:** Foram utilizados, como moduladores, NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) ao longo de 48 horas. A hipóxia foi induzida com  $\text{CoCl}_2$  por 24 horas; hipóxia química moderada (800  $\mu$ M) e intensa (2 mM). (A) gráfico de barras representativo das análises de MTT com os astrócitos expostos a hipóxia moderada, e (B) Gráfico de barras representativo das análises de MTT com os astrócitos expostos a hipóxia intensa (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão, e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \* $p < 0.01$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao grupo sem tratamento. •••• $p < 0.00001$  em relação ao grupo exposto somente a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM).

**Figura 7:** Viabilidade celular dos astrócitos primários do córtex dos animais SHR frente ao tratamento prévio com moduladores de SIRT6 por 48 horas e exposição a hipóxia química por 24 horas



**Legenda:** Foram utilizados, como moduladores, NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) ao longo de 48 horas. A hipóxia foi induzida com  $\text{CoCl}_2$  por 24 horas; hipóxia química moderada (800  $\mu$ M) e intensa (2 mM). (A) gráfico de barras representativo das análises de MTT com os astrócitos expostos a hipóxia moderada, e (B) Gráfico de barras representativo das análises de MTT com os astrócitos expostos a hipóxia intensa (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão, e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao grupo sem tratamento. \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação ao grupo exposto somente a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM).



### **3.1.4 Investigação da modificação epigenética – Western-Blot**

Para verificar se os efeitos sobre a viabilidade dos astrócitos Wistar e SHR poderiam estar relacionados com uma modificação epigenética causada pelo tratamento com os moduladores de SIRT6, foram investigados os níveis proteicos da histona 3 resíduo de lisina 9 acetilado (H3K9ac) em relação os níveis de histona 3 total. Essa região, quando acetilada, é relacionada à promoção da transcrição de genes que, por sua vez, poderiam trazer benefícios a diversas funções metabólicas das células (Gates et al., 2017) e, conseqüentemente, protegê-las da morte celular induzida pela hipóxia.

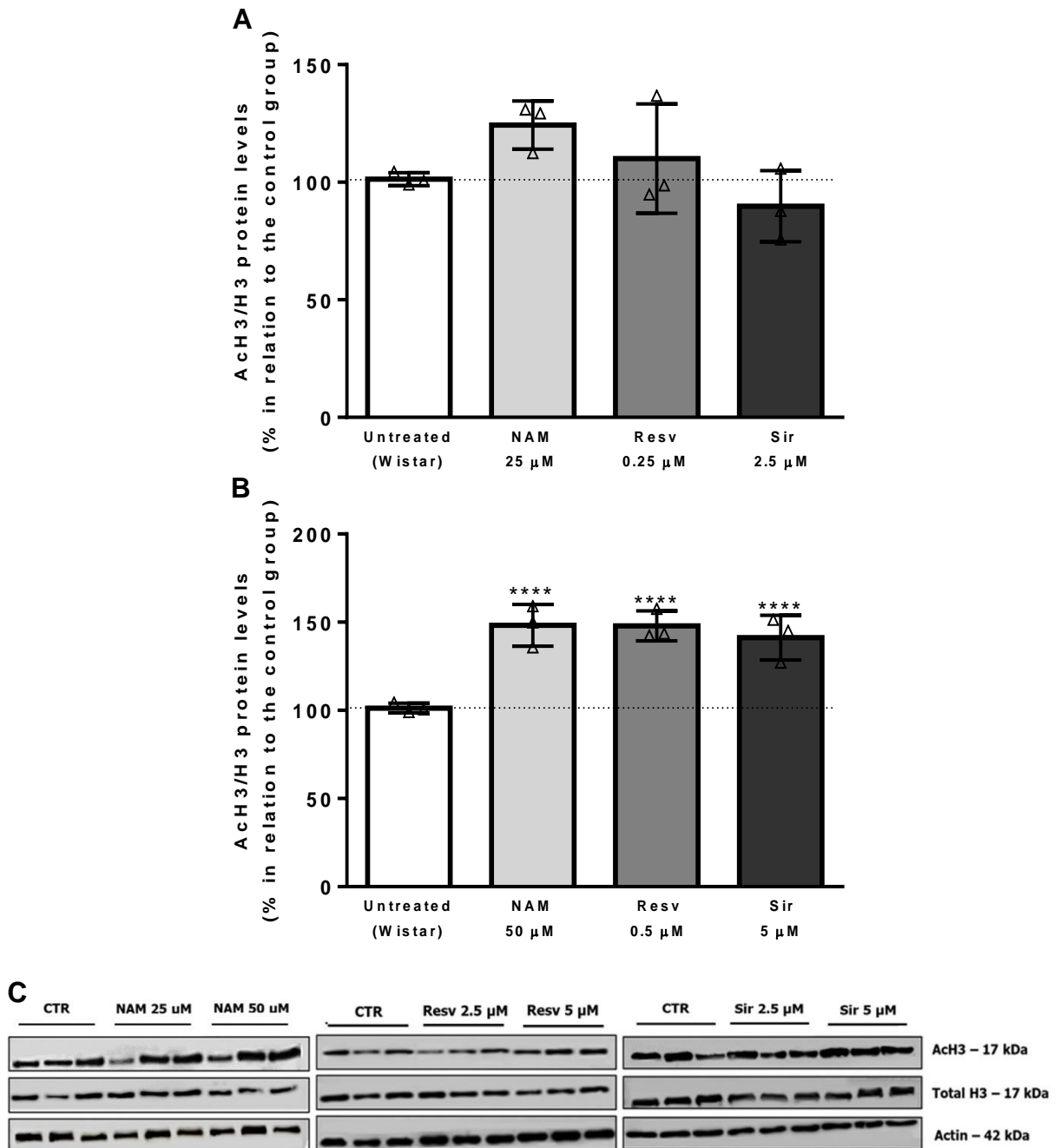
Para o teste, os astrócitos Wistar e SHR foram expostos às concentrações mais baixas dos moduladores de SIRT6 (NAM 25 e 50  $\mu$ M, Rsv 0.25 e 0.5  $\mu$ M e Sir 2.5 e 5  $\mu$ M) por 48 horas.

Podemos observar que nos astrócitos primários do córtex de animais controle (Wistar), as concentrações mais baixas dos moduladores, NAM 25  $\mu$ M, Rsv 0.25  $\mu$ M e Sir 2.5  $\mu$ M não foram capazes de alterar o estado de acetilação da H3 (Figura 8 A). No entanto, quando os astrócitos foram expostos às concentrações mais altas, NAM 50  $\mu$ M, Rsv 0.5  $\mu$ M e Sir 5  $\mu$ M, observou-se um aumento da acetilação da histona 3 (Figura 8 B). A figura 8 C demonstra a imagem processada (corte específico na região do blot) do Western-Blot utilizada para a análise.

No caso dos astrócitos primários do córtex de animais SHR expostos às mesmas condições, observamos também, que as concentrações de NAM 25  $\mu$ M, Rsv 0.25  $\mu$ M e Sir 2.5  $\mu$ M não alteraram a acetilação na região H3K9 (Figura 9 A). Porém, assim como nos Wistar, as concentrações de NAM 50  $\mu$ M, Rsv 0.5  $\mu$ M e Sir 5  $\mu$ M promoveram a inibição das SIRT6, mantendo a região H3K9 acetilada (Figura 9 B).

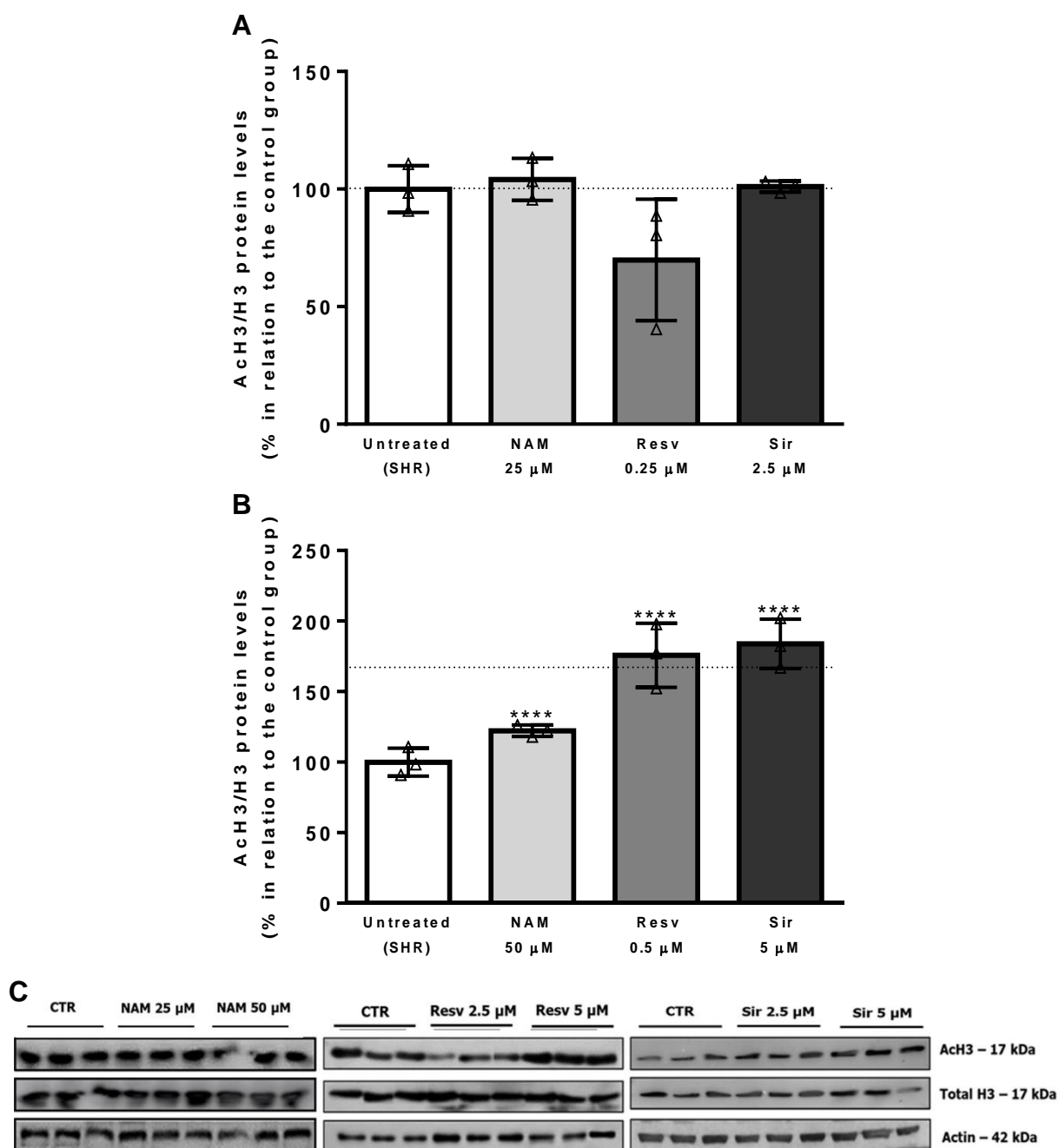
Ao analisar esses dados, apesar de termos uma redução da viabilidade nos astrócitos Wistar e SHR com as concentrações dos moduladores de SIRT6 propostos (Figura 6), observamos um aumento da viabilidade frente à hipóxia química (Figura 7) com uma concomitante o aumento da acetilação da H3K9ac (Figuras 8 e 9). Por essa razão, decidimos utilizar essas concentrações para a investigação da função mitocondrial. Vale lembrar que a verificação da indução da via da hipóxia nos astrócitos já foi realizada e publicada em E Silva et al., 2019.

**Figura 8:** Nível de acetilação da H3K9 em astrócitos primários do córtex de animais controle (Wistar)



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo das análises após a exposição das células a NAM 25  $\mu$ M, Rsv 0.25  $\mu$ M e Sir 2.5  $\mu$ M, (B) gráfico de barras representativo das análises após o tratamento com NAM 50  $\mu$ M, Rsv 0.5  $\mu$ M e Sir 5  $\mu$ M, e (C) membranas do western-blot (N = 3). Análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão, e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $P < 0.0001$  em relação ao grupo sem tratamento.

**Figura 9:** Nível de acetilação da H3K9 em astrócitos primários do córtex de animais SHR



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo das análises após a exposição das células a NAM 25  $\mu$ M, Rsv 0.25  $\mu$ M e Sir 2.5  $\mu$ M, (B) gráfico de barras representativo das análises após o tratamento com NAM 50  $\mu$ M, Rsv 0.5  $\mu$ M e Sir 5  $\mu$ M, e (C) membranas do western-blot (N = 3). Análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão, e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $P < 0.0001$  em relação ao grupo sem tratamento.

### **3.1.5 Investigação do metabolismo mitocondrial – estudo funcional**

Nessa seção demonstraremos os resultados das análises do metabolismo mitocondrial, começando pela homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  e seguindo para o potencial de membrana mitocondrial (MMP) e os níveis de superóxido mitocondrial. Em todos os casos, os grupos Wistar e SHR foram ajustados em 100% e as comparações foram realizadas parente a eles, separadamente, bem como, entre eles. Nas legendas dos gráficos serão descritas as simbologias utilizadas para as comparações e o valor de *P* respectivo.

#### **3.1.5.1 Homeostase de $\text{Ca}^{2+}$**

Para as análises de  $\text{Ca}^{2+}$ , os astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR foram incubados com o fluoróforo Fluo-4-AM. Esta molécula se liga ao  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico emitindo fluorescência.

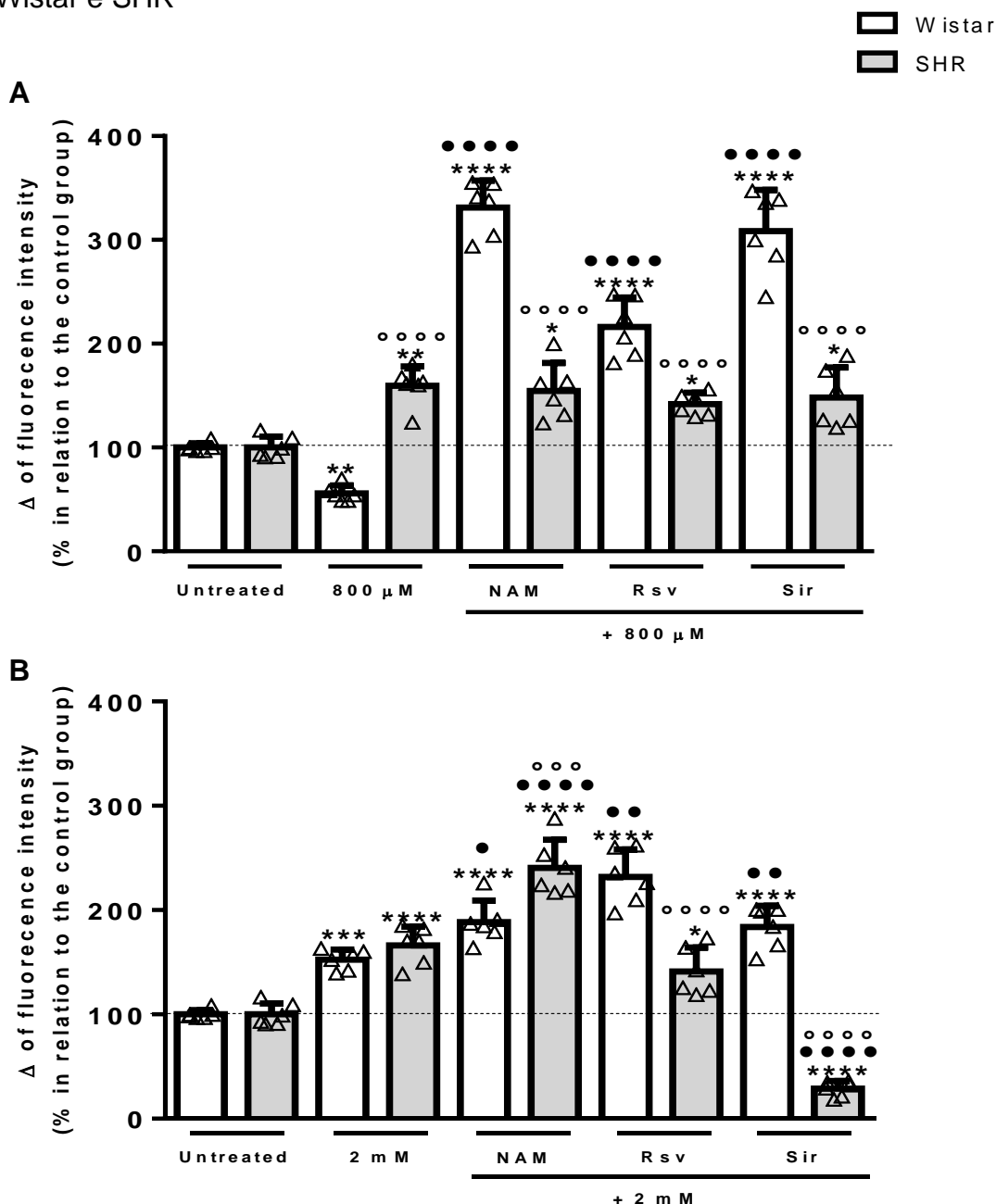
Podemos observar nos astrócitos de animais controle (Wistar) expostos a hipóxia química moderada (800  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas, uma redução do sinal fluorescente ( $\Delta$ ), de forma significativa, após a adição do FCCP (5  $\mu\text{M}$ ). O oposto ocorre nos astrócitos SHR, onde há um aumento do sinal (Figura 10 A). Ambos em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*). Esse dado indica que nos astrócitos controle a hipóxia moderada causa uma redução da captura de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias, enquanto nos SHR, há um aumento (Figura 10 A). No caso da exposição a hipóxia intensa (2 mM), ambos os grupos apresentaram um aumento significativo do sinal, indicando que suas mitocôndrias capturaram mais o íon (Figura 10 B).

Entretanto, quando as células controle (Wistar) foram previamente expostas aos moduladores de SIRT, vemos que na situação hipóxia moderada, em todos os casos, houve um aumento significativo do sinal do Fluo, indicando que havia mais  $\text{Ca}^{2+}$  nas mitocôndrias dos astrócitos controle (Wistar) em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*) e ao grupo exposto somente a hipóxia (Figura 10 A). Porém, no caso dos SHR, não vemos essa alteração (Figura 10 A).

Quando as células foram previamente tratadas com os moduladores e expostas a hipóxia química intensa (2 mM), vemos que nos astrócitos controle (Wistar) há, também, um aumento do sinal fluorescente, indicando uma maior captura de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas mitocôndrias dos astrócitos Wistar em relação ao grupo sem tratamento e exposto somente a hipóxia (Figura 10 B). No caso dos SHR, apenas o tratamento com NAM aumenta de forma significativa o sinal fluorescente, indicando

que nessa condição as mitocôndrias captaram mais o íon em relação ao grupo sem tratamento e ao grupo exposto somente a hipóxia (Figura 10 B). No caso do tratamento prévio com Rsv, não houve alterações. Entretanto, o tratamento prévio com Sir, causou uma redução significativa do sinal fluorescente em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*) e ao grupo exposto somente a hipóxia intensa (Figura 10 B). Esse dado demonstra que nos astrócitos controle os moduladores aumentam a capacidade de retenção de  $\text{Ca}^{2+}$  das mitocôndrias, enquanto nos astrócitos SHR, apenas o NAM exerce esse efeito e apenas na condição de hipóxia intensa.

**Figura 10:** Liberação de cálcio mitocondrial em astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50 μM), Rsv (0.5 μM) e Sir (5 μM) por 48 horas, e CoCl<sub>2</sub> (800 μM e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo dos níveis de cálcio citosólico após hipóxia moderada e modulação de SIRT<sub>s</sub>, e (B) gráfico de barras representativo dos níveis de cálcio citosólico após hipóxia intensa e modulação de SIRT<sub>s</sub> (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média ± desvio padrão, e em porcentagem do respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Os gráficos de barras representam o delta (Δ) da intensidade de fluorescência (FCCP; 5 μM). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significante, p<0.05. \*p<0.01, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001 e \*\*\*\*p<0.00001, em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); •p<0.01, ••p<0.001, e •••p<0.00001, em relação aos grupos expostos apenas a hipoxia química (800 μM ou 2 mM); †p<0.01, ††p<0.001 e †††p<0.00001, em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

### **3.1.5.2 Potencial de membrana mitocondrial**

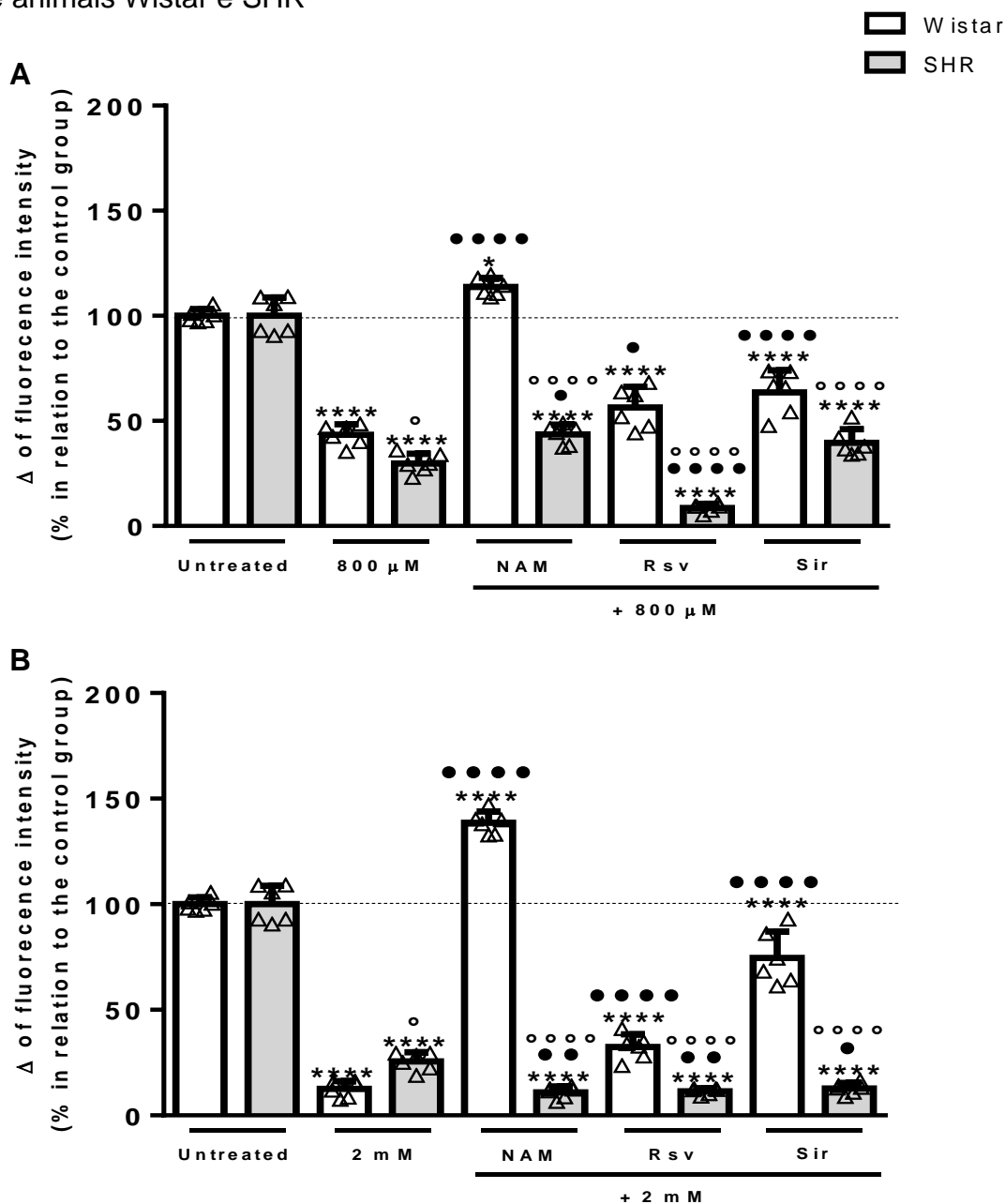
Sabe-se que as alterações na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  podem alterar o potencial de membrana mitocondrial (MMP), portanto esse parâmetro foi investigado. Observamos que em ambos os casos de hipóxia química (moderada ou intensa) há uma redução significativa do sinal fluorescente do TMRE no citosol em ambos os astrócitos (controle e SHR). Esse dado indica que a hipóxia química causa uma despolarização mitocondrial (Figura 11 A e B).

Quando os astrócitos dos animais Wistar foram submetidos ao tratamento prévio com o modulador NAM e depois expostos a hipóxia química moderada (800  $\mu\text{M}$ ) houve um aumento significativo do sinal do TMRE a níveis superiores aos basais, indicando uma repolarização mitocondrial (Figura 11 A). Já no caso do tratamento com os moduladores Rsv e Sir, o sinal do fluoróforo aumentou significativamente quando comparado com o grupo exposto somente à hipóxia sugerindo que, ambos, protegem os astrócitos da despolarização (Figura 11 A).

No caso dos astrócitos SHR, apenas o tratamento prévio com NAM aumentou o sinal do TMRE em comparação ao grupo exposto somente à hipóxia, o que poderia indicar uma proteção (Figura 11 B). No caso do Rsv houve uma queda significativa do sinal em comparação com os grupos sem tratamento (*Untreated*) e ao grupo exposto somente a hipóxia química moderada o que indica uma maior despolarização do MMP (Figura 11 A).

Na análise do tratamento prévio com os moduladores e exposição à hipóxia química intensa (2 mM) nos astrócitos controle (Wistar), novamente, todos os moduladores de SIRTs promoveram um aumento do sinal do TMRE (Figura 11 B), em relação ao grupo exposto somente hipóxia. No entanto, nos astrócitos SHR, todos os moduladores causam uma redução significativamente maior do sinal do TMRE quando comparado com o grupo sem tratamento, aos grupos expostos somente a hipóxia e em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento, indicando a despolarização mitocondrial (Figura 11 B). Ou seja, os moduladores preveniram a despolarização da mitocôndria em animais Wistar, e não modulou tal função nos animais SHR.

**Figura 11:** Despolarização da membrana mitocondrial dos astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50 μM), Rsv (0.5 μM) e Sir (5 μM) por 48 horas, e CoCl<sub>2</sub> (800 μM e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises do MMP após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo das análises do MMP após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média ± desvio padrão, e em porcentagem do respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Os gráficos de barras representam o delta (Δ) da intensidade de fluorescência (FCCP; 5 μM). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo, p<0.05. \*\*\*\*p<0.00001 em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \*p<0.01, \*\*p<0.001 e \*\*\*\*p<0.00001, em relação aos grupos expostos apenas a hipoxia (800 μM ou 2 mM); °p<0.01 e °°°°p<0.00001, em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.



### **3.1.5.3 Níveis de superóxido mitocondrial**

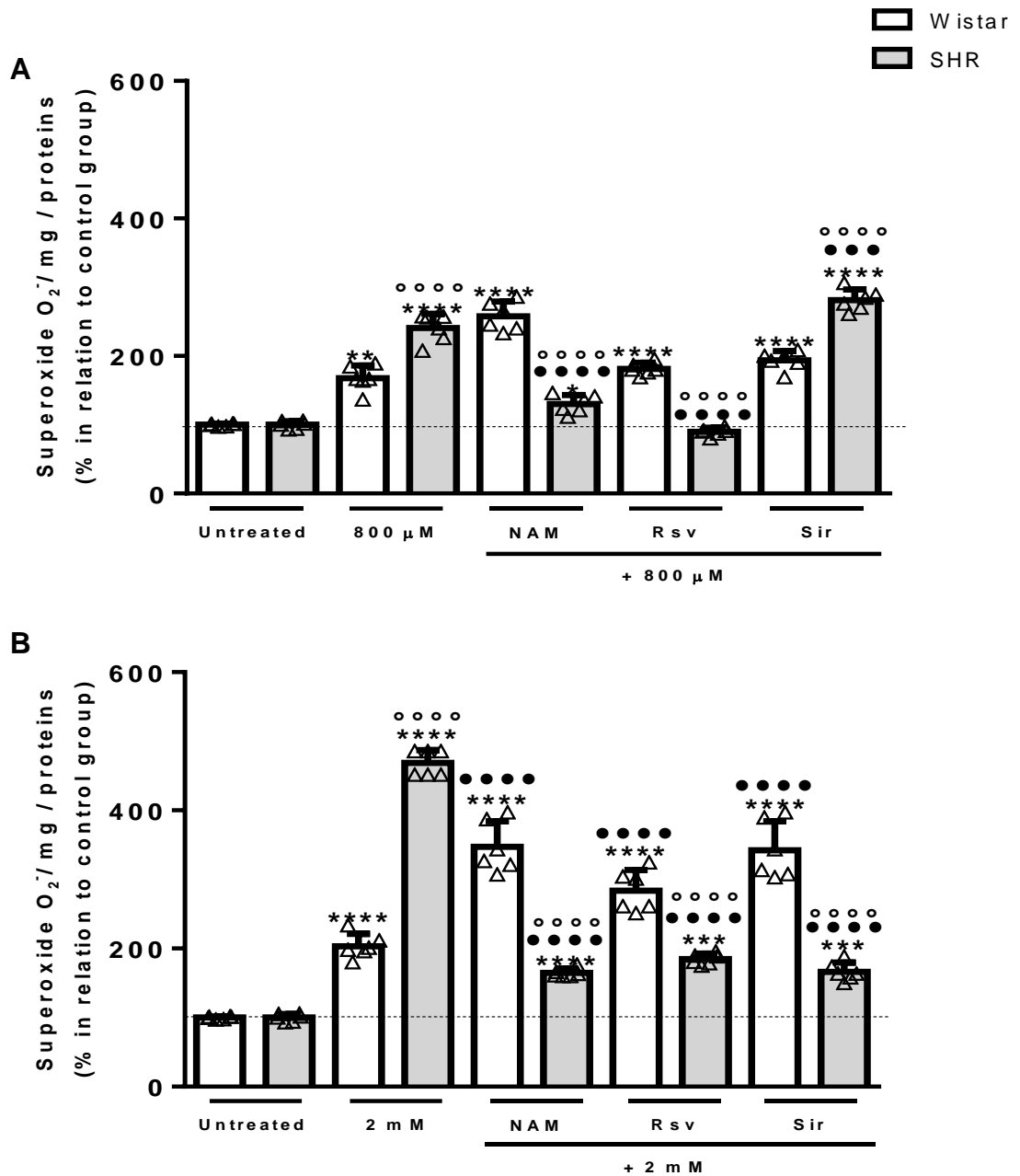
Como as alterações na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  e no MMP podem influenciar na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o superóxido, nós investigamos seus níveis através do fluoróforo mitosox.

Quando observamos os dados dos astrócitos controle (Wistar) e SHR expostos a hipóxia química moderada e intensa, vemos um aumento significativo do sinal do mitosox, indicando que sob hipóxia química as mitocôndrias dos astrócitos geram mais esse radical. Vale dizer, que o efeito da hipóxia química sobre os astrócitos SHR é significativamente maior quando comparado com o grupo controle (Wistar) (Figura 12 A e B).

Quando os astrócitos controle (Wistar) foram submetidos ao tratamento prévio com os moduladores de SIRT6, vemos que nenhum deles foi capaz de proteger as células do aumento do radical (Figura 12 A). Porém, no caso dos astrócitos SHR, o tratamento prévio com NAM e Rsv demonstra uma diminuição do sinal do mitosox quando comparado com o grupo sem tratamento, grupo exposto somente a hipóxia, bem como em relação ao grupo Wistar na mesma condição, indicando um efeito antioxidante. Contudo, o tratamento prévio com Sir, exerce o efeito oposto, aumentando o sinal em todas as comparações, o que indica que há a maior produção do radical nessa condição (Figura 12 A).

De forma curiosa, na exposição à hipóxia química intensa (2 mM), nos astrócitos controle (Wistar) previamente tratados com os moduladores, em todos os casos, há um aumento do sinal do mitosox quando comparado com o grupo sem tratamento e o grupo exposto somente a hipóxia (Figura 12 B). Contrariamente, nos astrócitos SHR, vemos que todos os compostos geram uma proteção, reduzindo o sinal do mitosox em comparação ao grupo exposto somente a hipóxia e, ainda, em relação ao grupo Wistar na mesma condição (Figura 12 B). Esse dado demonstra que nos astrócitos SHR ocorre uma proteção contra a formação deste radical, que parece ser otimizada quando as células estão numa situação de hipóxia intensa.

**Figura 12:** Níveis de superóxido e efeito antioxidante em astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50 μM), Rsv (0.5 μM) e Sir (5 μM) por 48 horas, e CoCl<sub>2</sub> (800 μM e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT6, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT6 (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média ± desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo, p<0.05. \*p<0.01, \*\*p<0.001 e \*\*\*\*p<0.00001, em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \*\*\*p<0.0001 e \*\*\*\*p<0.00001, em relação aos grupos expostos a hipoxia (800 μM ou 2 mM); °°°°p<0.00001, em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

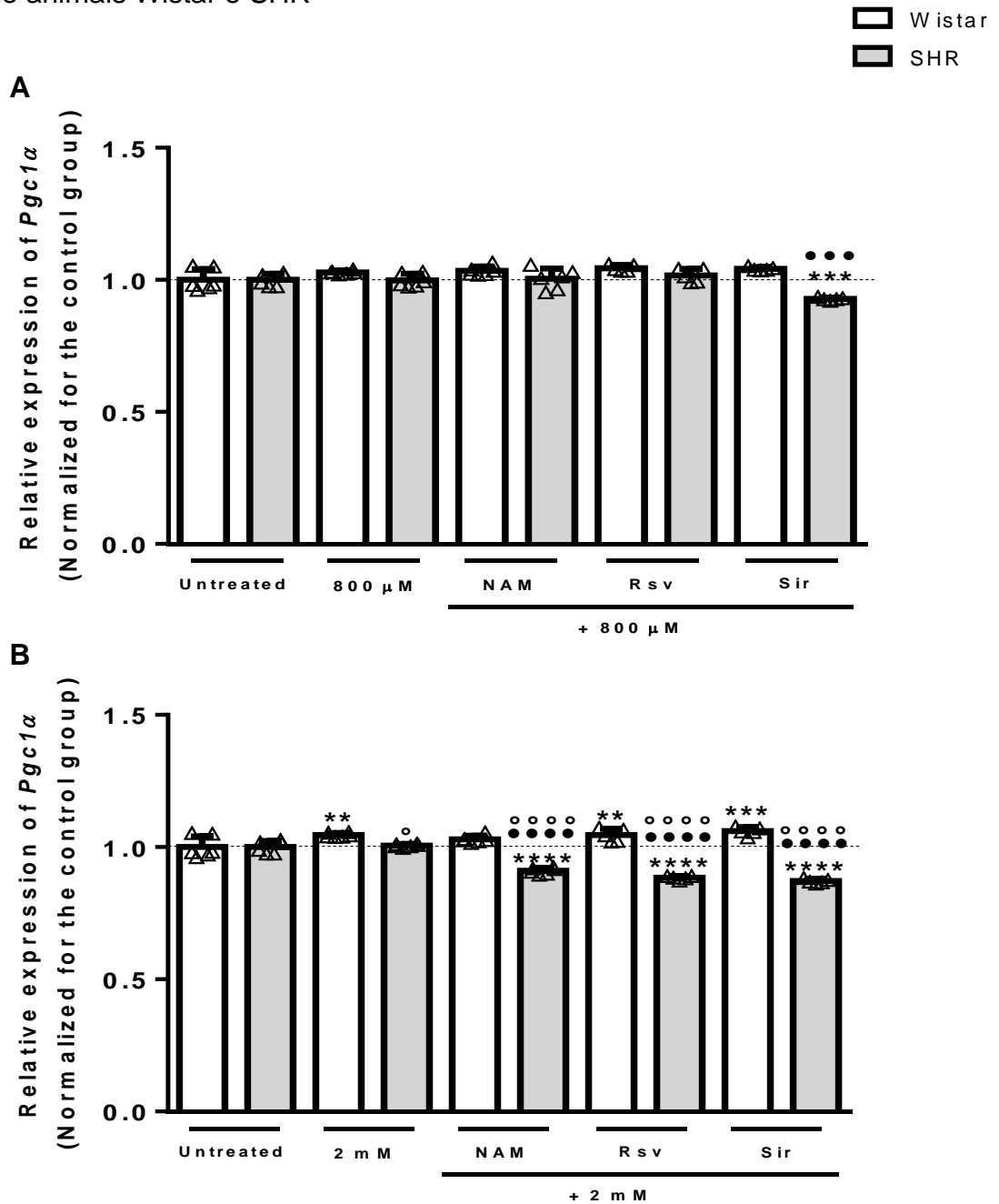
### **3.1.6 Investigação do metabolismo mitocondrial – PCR em tempo real**

Ao observar as alterações na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ , MMP e nos níveis de geração de superóxido induzidas pela hipóxia e alteradas pela modulação das SIRTs, investigamos por PCR em tempo real (qPCR) a expressão de genes envolvidos no metabolismo mitocondrial. Vale ressaltar, que todos os genes *housekeepings* que testamos para os astrócitos foram alterados pela hipóxia, esses dados encontram-se na dissertação de mestrado (E Silva et al., 2018). De fato, a literatura nos mostra que a hipóxia é um fator alterador de diversos genes considerados *housekeeping's* e que é difícil encontrar um adequado para a análise de qPCR, tendo ainda variações dependendo do tipo celular (Caradec et al., 2010; Gheisari et al., 2017; Da Baker et al., 2021). Nesse sentido, realizamos as comparações normalizando o *cycle threshold* (CT) do gene alvo, em relação ao CT do mesmo gene do grupo sem tratamento (*Untreated*), assim temos a expressão relativa do gene (Boutler et al., 2016; Kuhlmann et al., 2021).

Analizamos em primeiro lugar a expressão do gene regulador central da via da biogênese mitocondrial, o *Pgc1 $\alpha$*  (Weydt, et al., 2006). Observando os dados, vemos que não houve alterações nos astrócitos Wistar e SHR quando foram expostos a situação de hipóxia moderada (800  $\mu\text{M}$ ). Já no caso da hipóxia intensa, há um aumento significativo da expressão nos astrócitos Wistar quando comparado com o grupo sem tratamento (Figura 13 A). Quando as células Wistar e SHR foram previamente tratadas com os moduladores de expostas a hipóxia moderada, vemos que apenas o Sir, nos astrócitos SHR, causa uma redução significativa da expressão do *Pgc1 $\alpha$*  em comparação ao grupo sem tratamento e ao grupo exposto somente a hipóxia (Figura 13 A).

Entretanto, quando os astrócitos Wistar foram submetidos ao tratamento prévio com os moduladores Rsv e Sir, houve um aumento significativo da expressão do *Pgc1 $\alpha$*  em relação ao grupo sem tratamento, porém similar ao observado na exposição a hipóxia intensa (Figura 13 B). No entanto, quando os astrócitos SHR foram submetidos ao tratamento prévio, vemos que há uma redução significativa da expressão do *Pgc1 $\alpha$*  em todos os casos, em relação ao grupo sem tratamento, ao grupo exposto somente a hipóxia intensa e em relação ao grupo Wistar das mesmas condições (Figura 13 B).

**Figura 13:** Alterações na expressão do gene *Pgc1 $\alpha$*  nos astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR

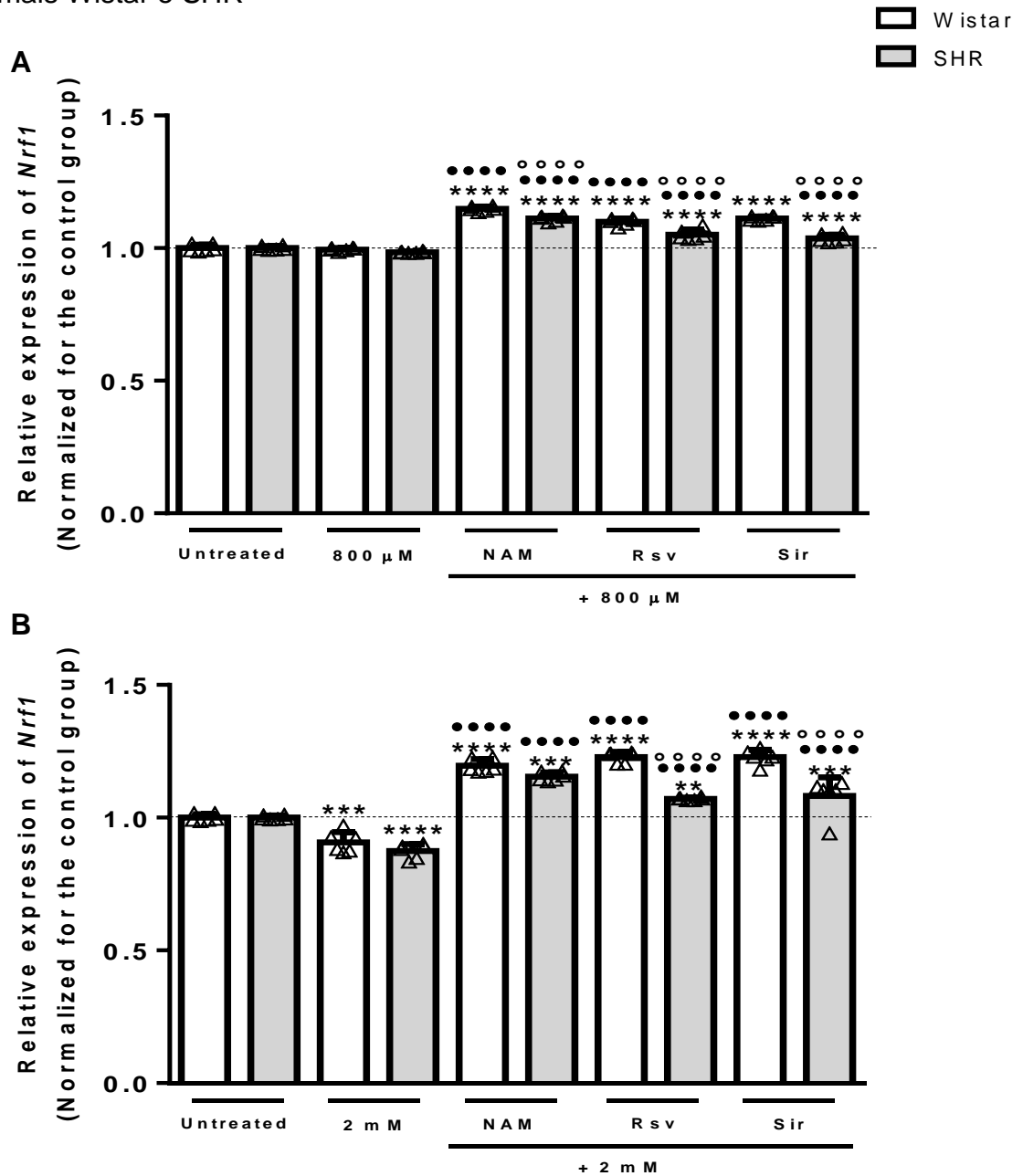


**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT1s, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT1s (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM). °°°° $p < 0.00001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

Ao verificar essas alterações no *Pgc1 $\alpha$* , fomos investigar a sequência de genes que fazem parte da via da biogênese mitocondrial. Investigamos, assim, a expressão do fator *Nrf1*, que induz a expressão de componentes proteicos nucleicos que fazem parte da cadeia respiratória mitocondrial (Kiyama et al., 2018). Observa-se que não ocorre nenhum efeito sob a expressão do *Nrf1*, tanto os astrócitos controle (Wistar) quanto nos SHR quando eles foram expostos a hipóxia moderada (800  $\mu$ M) (Figura 14 A). Entretanto, quando os dois grupos de astrócitos foram expostos a hipóxia intensa, observa-se uma redução significativa da expressão de *Nrf1* quando comparado com os respectivos grupos sem tratamento (*Untreated*) (Figura 14 B), o que sugere que a hipóxia intensa poderia diminuir a expressão dos componentes da cadeia respiratória, assim diminuindo a criação de novas mitocôndrias.

Entretanto, quando os astrócitos controle (Wistar) e SHR foram previamente tratados com os moduladores de SIRT6 e expostos às condições de hipóxia (moderada ou intensa) vemos que há um aumento significativo da expressão do *Nrf1* em todos os casos quando comparados com o grupo sem tratamento (*Untreated*) e exposto somente as condições de hipóxia (moderada ou intensa) (Figura 14 A e B). Esses resultados sugerem que os moduladores de SIRT6 podem influenciar na expressão do *Nrf1*, propiciando a expressão dos componentes da cadeia respiratória, o que poderia favorecer a criação de novas mitocôndrias.

**Figura 14:** Alterações na expressão do gene *Nrf1* nos astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR

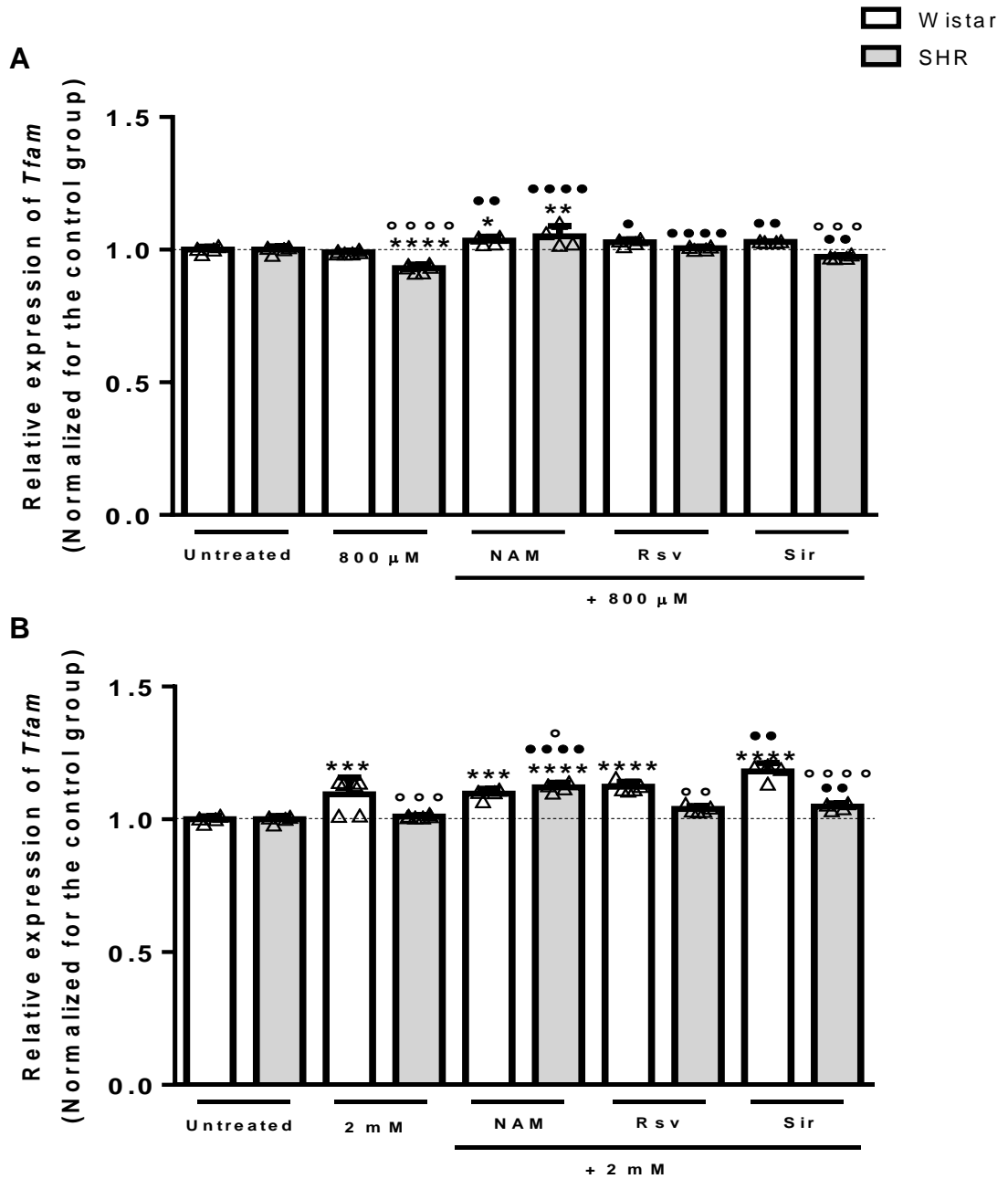


**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM). \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

Uma vez que observamos esse resultado com o *Nrf1*, fomos verificar a expressão do gene *Tfam*, que é estimulado pelo *Nrf1* e favorece a replicação do mtDNA durante a biogênese mitocondrial (Lee et al., 2017; Gureev et al., 2019). Podemos observar que quando os astrócitos controle (Wistar) foram expostos a hipóxia química moderada, não houve alterações na expressão do *Tfam*. Entretanto, a expressão do *Tfam*, encontra-se significativamente diminuída nos astrócitos SHR em relação ao seu grupo sem tratamento (*Untreated*) e em comparação com o grupo Wistar na mesma condição (Figura 15 A). No caso da hipóxia química intensa (2 mM), ocorre um aumento significativo da expressão do *Tfam* nos astrócitos Wistar em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*). Porém, nada acontece nos astrócitos SHR em relação ao grupo SHR sem tratamento (*Untreated*). Mas, a expressão do *Tfam* é significativamente menor em relação ao grupo Wistar na mesma condição (Figura 15 B).

Quando os astrócitos foram previamente tratados com os moduladores de SIRT6 e expostos a condição de hipóxia moderada, vemos que o NAM favorece de forma significativa a expressão do *Tfam* nos astrócitos Wistar e SHR em comparação com o respectivo grupo sem tratamento e exposto somente a hipóxia. O Rsv e o Sir também favorecem a expressão do fator significativamente, porém em relação ao respectivo grupo (Wistar e SHR) exposto somente a condição de hipóxia (Figura 15 A). No caso da hipóxia intensa, nos astrócitos controle (Wistar) previamente tratados com NAM e Rsv, a expressão do *Tfam* continua elevada no mesmo nível do que a hipóxia intensa (Figura 15 B). Mas, no caso do tratamento com Sir, ocorre o aumento significativo da expressão de *Tfam* em relação ao grupo sem tratamento e exposto somente a hipóxia (Figura 15 B). No caso dos SHR, o tratamento com Rsv não altera a expressão de *Tfam*, enquanto os tratamentos com NAM e Sir favorecem de forma significativa sua expressão (Figura 15 B). Esses dados reforçam a ideia de que está ocorrendo a criação de novas mitocôndrias, apesar de não ter um estímulo evidenciado do *Pgc1 $\alpha$* .

**Figura 15:** Alterações na expressão do gene *Tfam* nos astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR



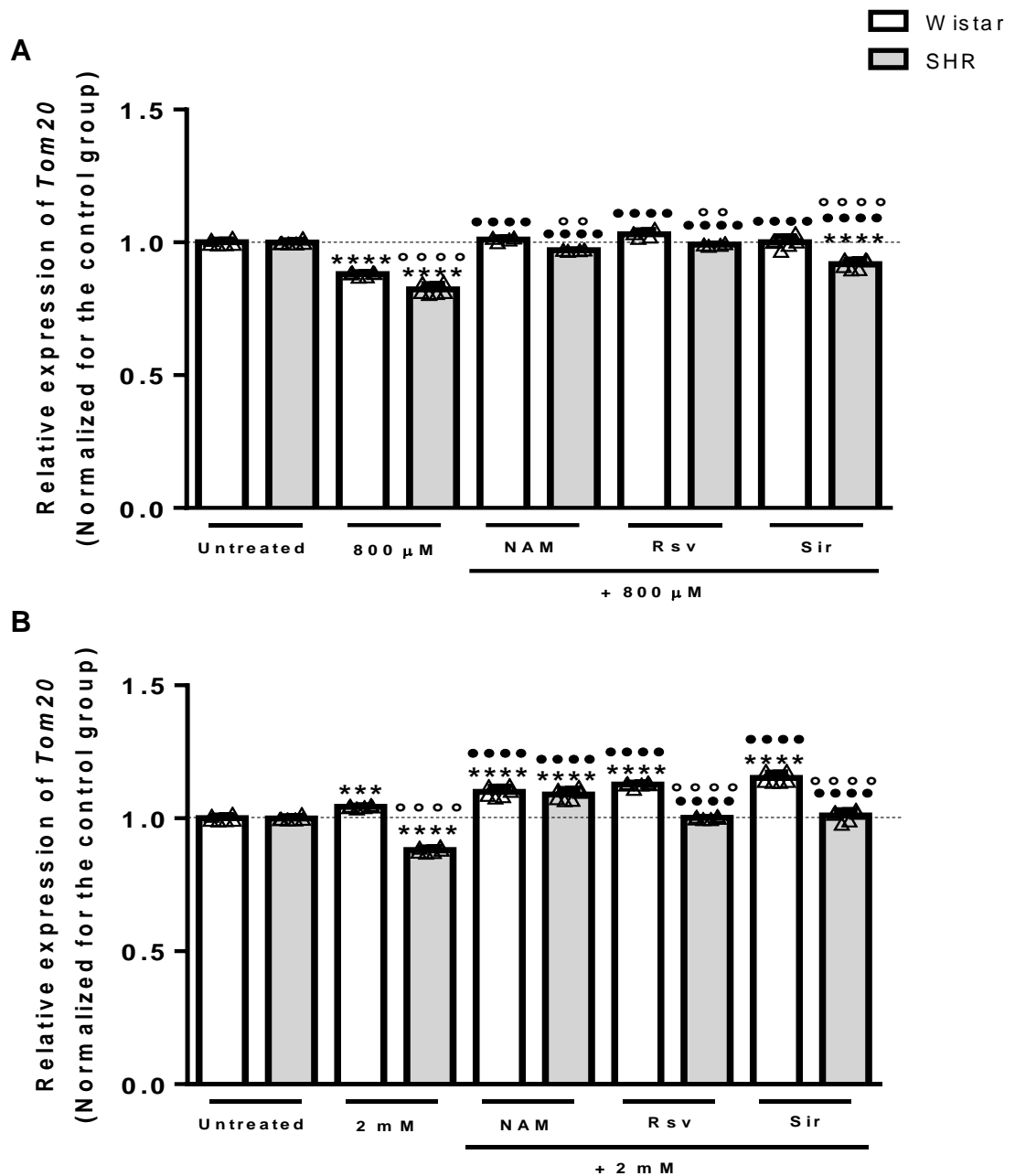
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT6, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT6 (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \*\* $p < 0.001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM).  $^{\circ}p < 0.01$ ,  $^{\circ\circ}p < 0.001$ ,  $^{\circ\circ\circ}p < 0.0001$  e  $^{\circ\circ\circ\circ}p < 0.00001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.



Para verificar se, de fato, estava sendo estimulada a biogênese mitocondrial, fomos avaliar a expressão do gene *Tom20* que é frequentemente utilizado como marcador para quantidade de mitocôndrias (Lavie et al., 2017). Vemos então que a hipóxia química moderada causa uma redução significativa da expressão de *Tom20* nos astrócitos Wistar e SHR em comparação com os respectivos grupos sem tratamento (Figura 16 A). No caso da hipóxia intensa (2 mM), nos astrócitos controle (Wistar), tem-se um aumento significativo da expressão do *Tom20* em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*). Enquanto nos astrócitos SHR, a hipóxia intensa causa uma diminuição significativa do *Tom20* em relação ao grupo SHR sem tratamento e em relação ao grupo Wistar na mesma condição (Figura 16 B).

Quando os astrócitos controle e SHR foram previamente tratados com os moduladores de SIRT6 e expostos a hipóxia moderada (800  $\mu$ M), vemos que em todos os casos há um aumento significativo da expressão do *Tom20* em comparação aos seus respectivos grupos sem tratamento e expostos somente a hipóxia (Figura 16 A). Vemos o mesmo efeito quando os astrócitos foram expostos a hipóxia química intensa (2 mM) (Figura 16 B).

**Figura 16:** Alterações na expressão do gene *Tom20* nos astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR

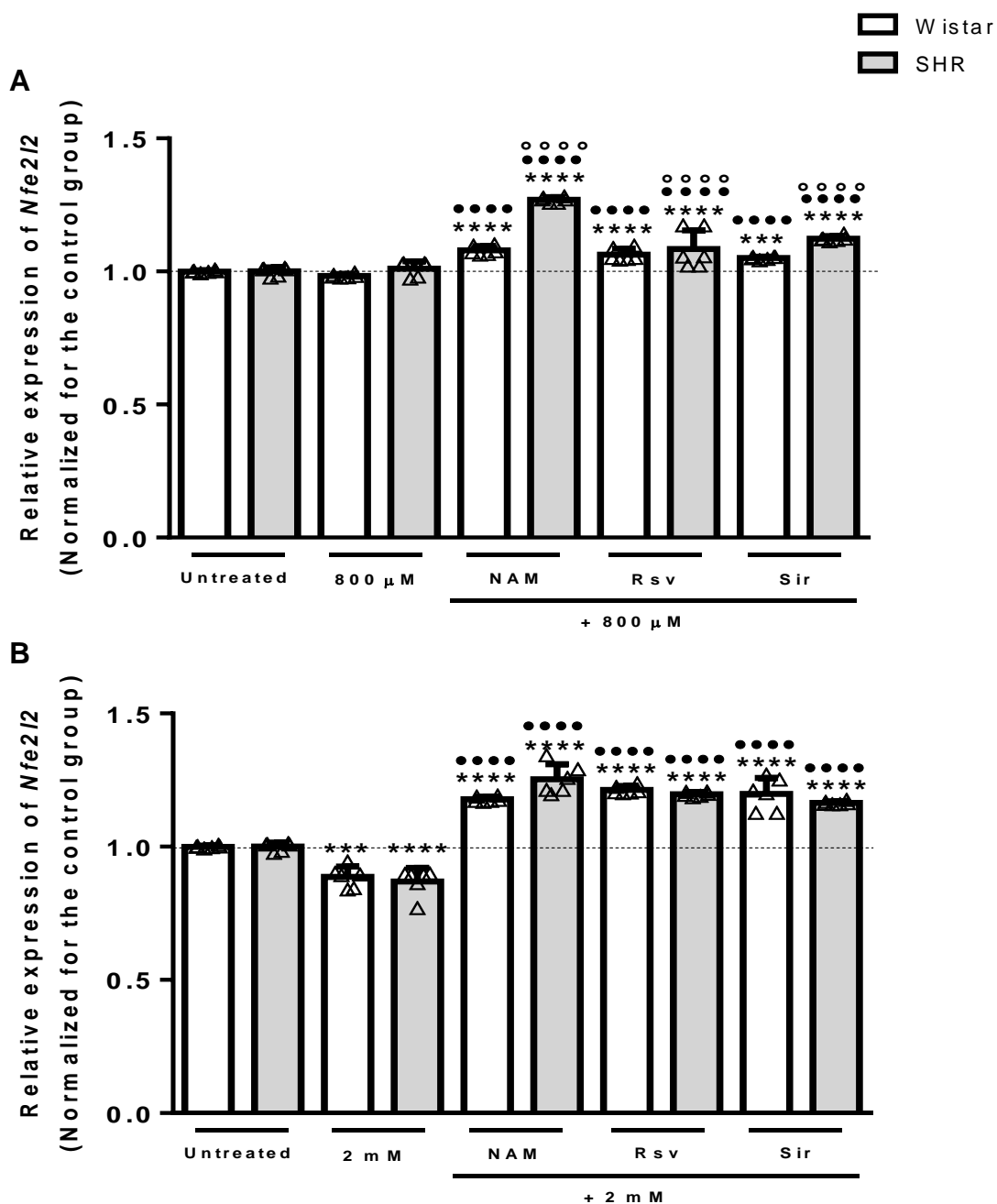


**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT1s, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT1s (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM); °°° $p < 0.001$  e °°°° $p < 0.00001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

Nesse sentido, os moduladores de SIRT<sub>s</sub> parecem induzir a criação de novas mitocôndrias. Esse dado é curioso, já que o regulador central da via da biogênese mitocondrial, o *Pgc1 $\alpha$*  não foi estimulado (Figura 13 A e B). Portanto, a via da biogênese, pode estar sendo estimulada de outra forma, como por exemplo através da expressão do gene *Nfe2l2* em decorrência do aumento de ROS (Piantadosi et al., 2008; Calvert et al., 2010; Lee et al., 2017; Gureev et al., 2019). De importância, tem-se o fato de que o *Nfe2l2* ainda é responsável pela expressão de fatores que atuarão nas defesas antioxidantes.

Quando observamos a expressão do *Nfe2l2* nos astrócitos controle (Wistar) e SHR expostos a hipóxia moderada (800  $\mu$ M), vemos que não há alterações significativas (Figura 17 A). Porém, na hipóxia química intensa, há uma redução significativa da expressão do fator em ambos (Wistar e SHR), em relação ao grupo sem tratamento (Figura 17 B). Interessantemente, quando as células foram previamente tratadas com os moduladores de SIRT<sub>s</sub> e expostas a hipóxia moderada, vemos que tanto nos astrócitos Wistar quanto nos SHR, tem-se um aumento da expressão do *Nfe2l2* de forma (Figura 17 A). Novamente, na exposição a hipóxia química intensa, todos os moduladores foram capazes de aumentar a expressão do *Nfe2l2* nos astrócitos Wistar e SHR significativamente em comparação ao grupo sem tratamento e exposto somente a hipóxia intensa (Figura 17 B). Esses achados demonstram que, de fato, poderia estar ocorrendo o estímulo da biogênese mitocondrial pela via indireta ao *Pgc1 $\alpha$* , sendo estimulada pelo *Nfe2l2*.

**Figura 17:** Alterações na expressão do gene *Nfe2l2* nos astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda.** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM). \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

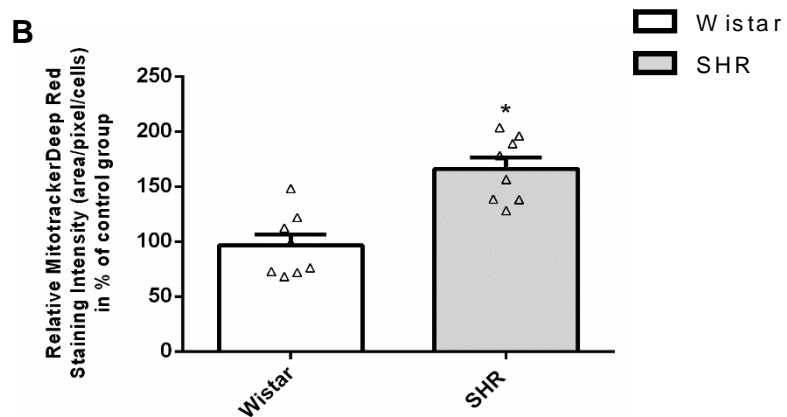
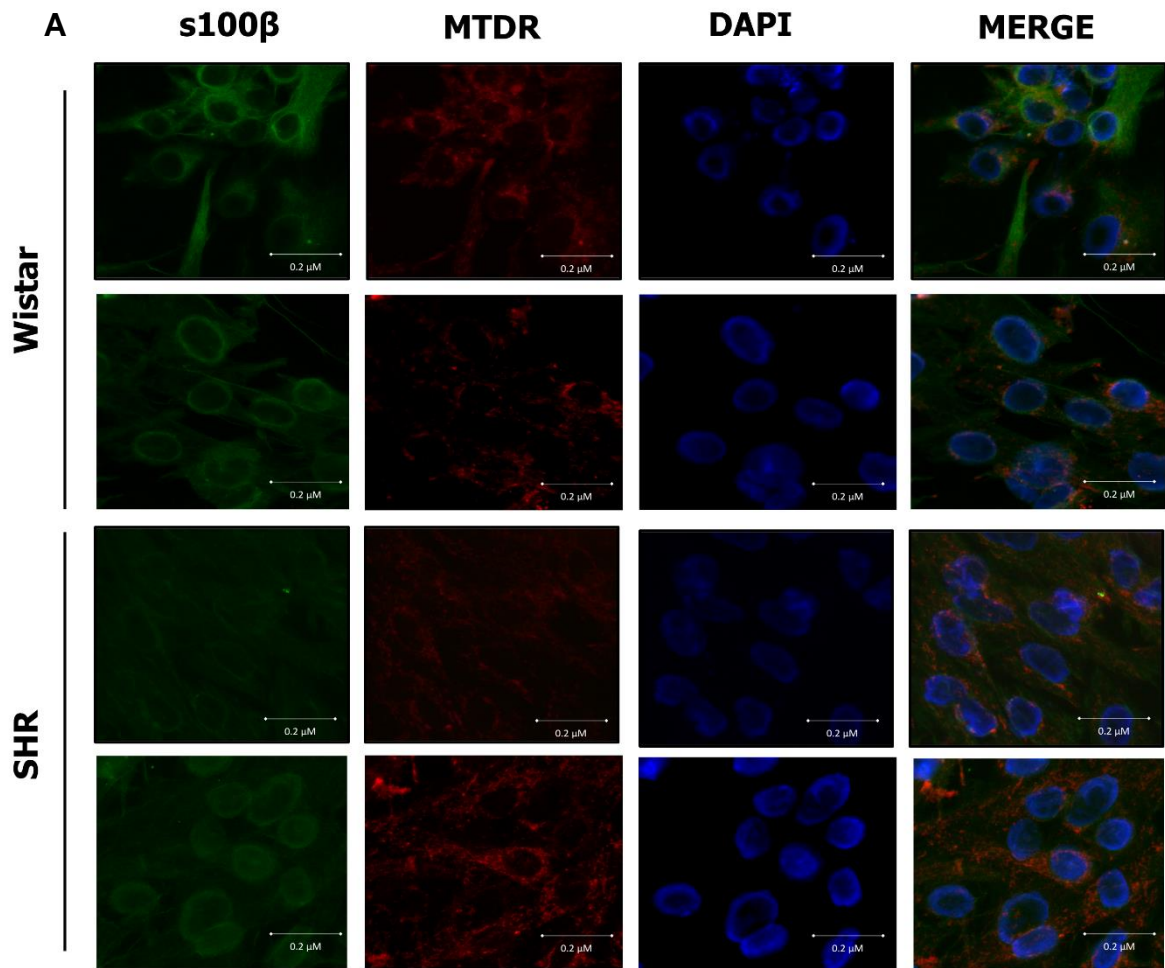
### **3.1.7 Análise da quantidade de mitocôndrias – Imunofluorescência**

Como vimos alterações nos genes responsáveis pela via da biogênese mitocondrial, como *Pgc1 $\alpha$* , *Nrf1* e *Nfe2l2*, decidimos investigar se os astrócitos SHR sem nenhum tratamento já tinham uma maior quantidade de mitocôndrias de forma natural. Nesse sentido, poderíamos ter alguma noção do porquê ocorrem tais alterações observadas após a exposição a hipóxia intensa e tratamento com os moduladores de SIRTs. No caso, utilizamos o marcador de mitocôndrias *mitotracker deep red* (MTDR) e analisamos por imunofluorescência a quantidade de mitocôndrias presentes nos astrócitos Wistar e SHR sem tratamento. Do mesmo modo que nos testes de caracterização, foi utilizado o anticorpo S100 $\beta$  para marcar os astrócitos maduros (ver 2.3).

Podemos observar na imagem representativa da imunofluorescência com a objetiva de 40x (escala de 0.2  $\mu$ M), que de fato, há maior marcação de MTDR (vermelha) nos astrócitos SHR marcados em verde com o anticorpo S100 $\beta$  (Figura 18 A). Ainda, podemos ver que há uma maior intensidade do *threshold* da fluorescência vermelha em área/pixels/células nos astrócitos SHR, o que indica que essas células possuem uma quantidade maior de mitocôndrias em comparação com o grupo Wistar (Figura 18 A e B).

Com essa análise, podemos dizer que, de fato, os astrócitos de animais SHR possuem mais mitocôndrias do que os astrócitos de animais Wistar, isso pode estar relacionado ao fato de que esses animais passam por uma situação de hipóxia fetal (ou intraútero) que parece estimular a via da biogênese de forma natural (E Silva et al., 2019). E ainda, como vimos, a própria hipóxia química estimula essa via de uma maneira indireta nos astrócitos controle (Wistar), reforçando que há a possibilidade de novas mitocôndrias estarem sendo criadas após o novo estímulo de hipóxia.

**Figura 18:** Marcação da quantidade de mitocôndrias nos astrócitos Wistar e SHR pelo MTDR



**Legenda:** (A) representação da imunofluorescência, fotografias da objetiva de 40x (escala de 0.2  $\mu$ m). (B) gráfico de barras representativo na intensidade de marcação vermelha (área/pixel/células) normalizado em porcentagem do grupo controle (N = 8). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão. Análise estatística foi feita com teste T de *student*. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \* $p < 0.01$  em relação ao grupo Wistar.

**Tabela 1: resumos dos resultados – seção astrócitos**

Astrócitos Wistar - TABELA DE RESULTADOS - Investigação do metabolismo mitocondrial e qPCR									
* em relação a hipóxia									
EXPERIMENTO	CoCl <sub>2</sub> 800 μM	CoCl <sub>2</sub> 800 μM				CoCl <sub>2</sub> 2 mM	CoCl <sub>2</sub> 2 mM		
		NAM (50 μM)	RSV (0.5 μM)	SIRT (5 μM)			NAM (50 μM)	RSV (0.5 μM)	SIRT (5 μM)
FLUO-4 (Ca <sup>2+</sup> citosólico)	↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
TMRE (Δψm)	↓	↑ e ↑*	↓ e ↑*	↓ e ↑*		↓	↑ e ↑*	↓ e ↑*	↓ e ↑*
Mitosox (superóxido)	↑	↑	↑	↑		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Pgc1α</i>	-	-	-	-		↑	-	↑	↑
<i>Nrf1</i>	-	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑		↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Nfe2l2</i>	-	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Tfam</i>	-	↑ e ↑*	↑*	↑*		↑	↑	↑	↑ e ↑*
<i>Tom20</i>	↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*

**Legenda:** Foram reunidos os resultados dos testes de função mitocondrial com Fluo-4-AM, TMRE e mitosox e, ainda, foram reunidos os resultados obtidos nos testes de expressão do *Pgc1α*, *Nrf1*, *Nfe2l2*, *Tfam* e *Tom20*. A seta sem o asterisco representa a comparação entre o grupo controle. A seta com asterisco e em negrito representa a comparação entre o grupo exposto somente a hipóxia.

**Tabela 2: resumos dos resultados – seção astrócitos**

Astrócitos SHR - TABELA DE RESULTADOS - Investigação do metabolismo mitocondrial e qPCR									
* em relação a hipóxia									
EXPERIMENTO	CoCl <sub>2</sub> 800 μM	CoCl <sub>2</sub> 800 μM				CoCl <sub>2</sub> 2 mM	CoCl <sub>2</sub> 2 mM		
		NAM (50 μM)	RSV (0.5 μM)	SIRT (5 μM)			NAM (50 μM)	RSV (0.5 μM)	SIRT (5 μM)
FLUO-4 (Ca <sup>2+</sup> citosólico)	↑	↑	↑	↑		↑	↑ e ↑*	↑	↓ e ↓*
TMRE (Δψ <sub>m</sub> )	↓	↓ e ↑*	↓ e ↓*	↓		↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
Mitosox (superóxido)	↑	↑ e ↓*	↓*	↑ e ↑*		↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
<i>Pgc1α</i>	-	-	-	↓ e ↓*		-	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
<i>Nrf1</i>	-	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Nfe2l2</i>	-	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Tfam</i>	↓	↑ e ↑*	↑*	↑*		-	↑ e ↑*	-	↑*
<i>Tom20</i>	↓	↑*	↑*	↑*		↓	↑ e ↑*	↑*	↑*

**Legenda:** Foram reunidos os resultados dos testes de função mitocondrial com Fluo-4-AM, TMRE e mitosox e, ainda, foram reunidos os resultados obtidos nos testes de expressão do *Pgc1α*, *Nrf1*, *Nfe2l2*, *Tfam* e *Tom20*. A seta sem o asterisco representa a comparação entre o grupo controle. A seta com asterisco e em negrito representa a comparação entre o grupo exposto somente a hipóxia.



## **3.2 Resultados Neurônios**

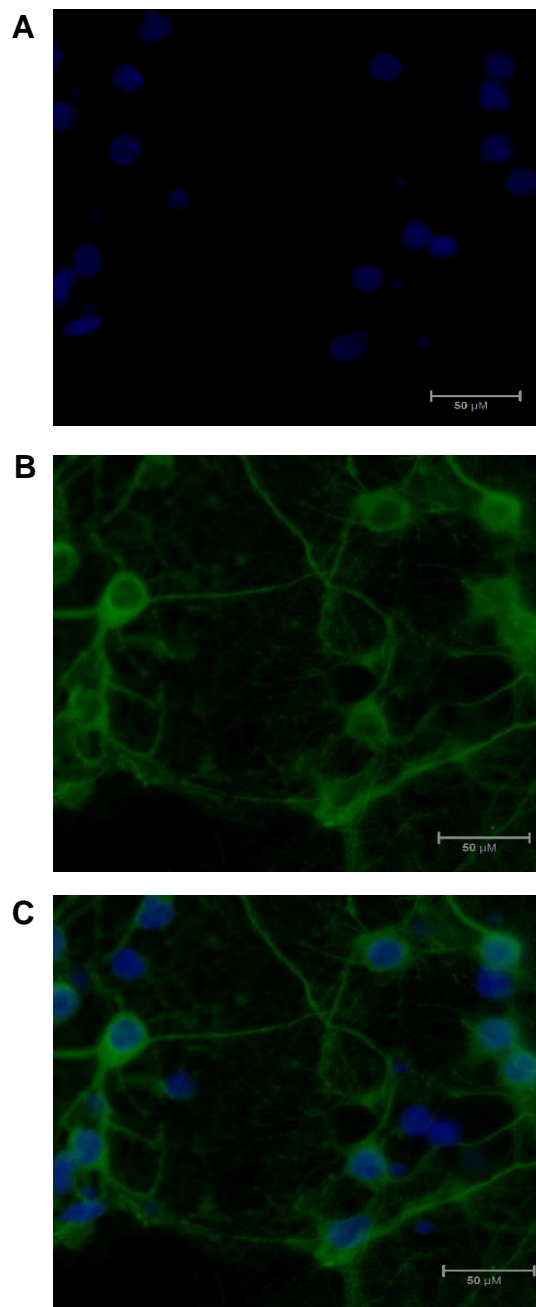
Nessa seção demonstraremos as diferenças entre os neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR (modelo de hipóxia neonatal) e, também, os resultados obtidos após a exposição à hipóxia química e o tratamento prévio com os moduladores de SIRT6.

### **3.2.1 Caracterização da cultura primária de neurônios – Imunofluorescência**

Antes de iniciarmos nossos experimentos relacionados a função mitocondrial, realizamos a caracterização da cultura primária de neurônios por dois métodos, imunofluorescência e citometria de fluxo, para que tivéssemos certeza de que estávamos avaliando, majoritariamente, o tipo celular que propusemos. Observamos nas figuras 19 e 20, que nas células Wistar e SHR houve marcação com o anticorpo MAP2 (verde). Na figura 21 A, que é o gráfico representativo da imunomarcação de células controle (Wistar), vemos que 93,3% eram positivas para MAP2 e que 6,67% eram inespecíficas. Já na figura 21 B, que é o gráfico representativo da imunomarcação com células SHR, vemos que 91,4% eram positivas para MAP2 e que 8,6% eram inespecíficas. Já na figura 22 B, que é a representação gráfica da citometria de fluxo (ver seção 2.5.2), vemos que 87% das células eram positivas para NeuN e em apenas 1,8% houve marcação inespecífica.

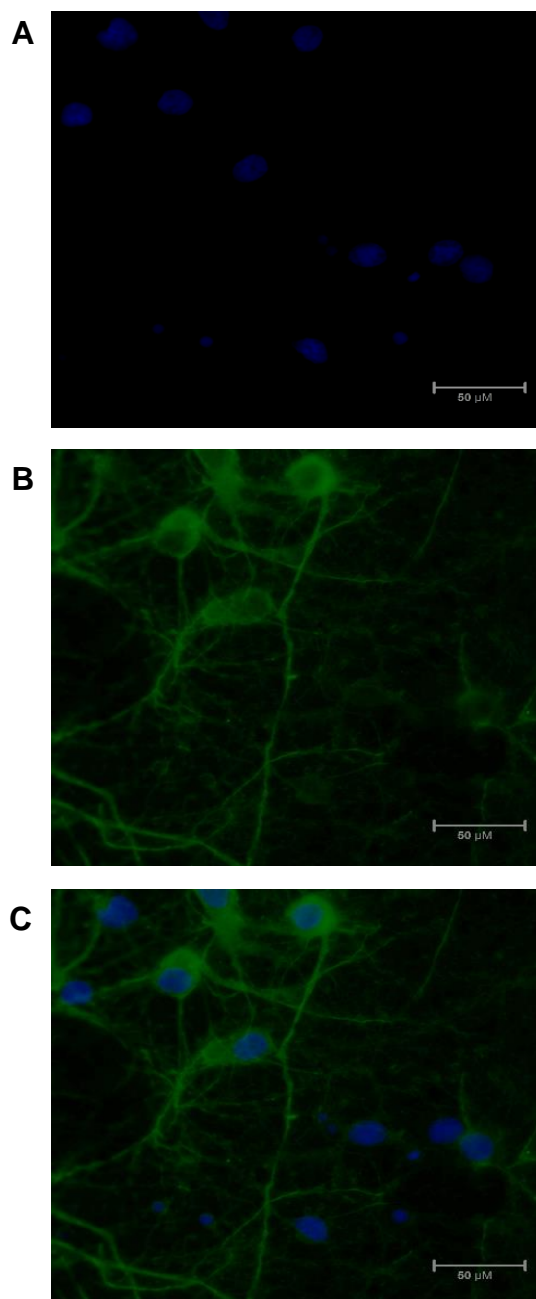
Esses dados demonstram que nossa cultura primária era majoritariamente composta de neurônios.

**Figura 19:** Imunomarcção representativa da caracterização dos neurônios primários do córtex de animais Wistar



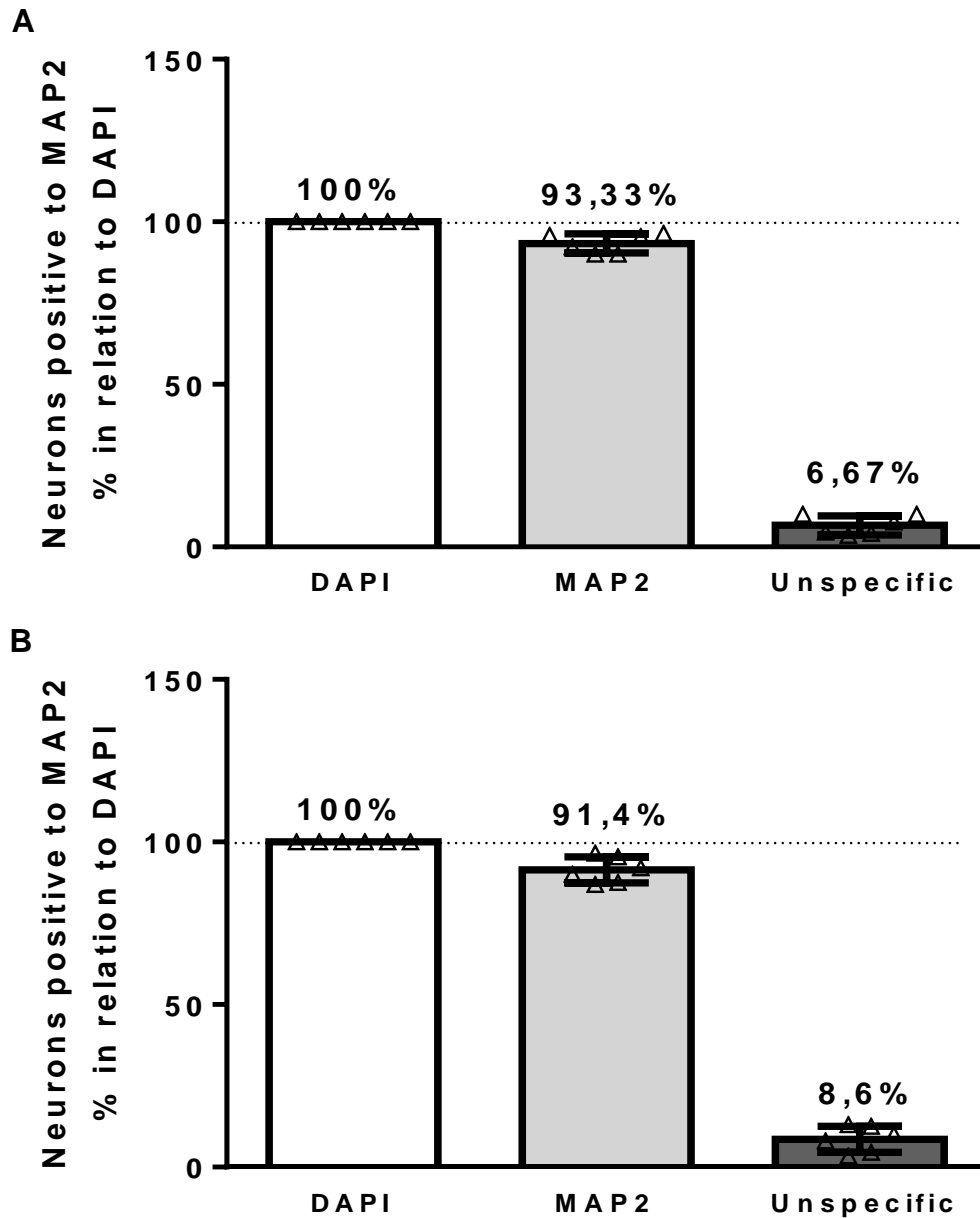
**Legenda:** Imunofluorescência foi realizada com anticorpo MAP2 para marcação de neurônios maduros 1:500 (verde) e DAPI para a marcação do núcleo celular 1:10.000 (azul). Imagens adquiridas com a objetiva de 40x (escala de 50 µM). (A) Representação da imunofluorescência com DAPI, (B) Representação da imunofluorescência com MAP2, e (C) Representação do *merge* entre o DAPI e o MAP2.

**Figura 20:** Imunomarcção representativa da caracterização dos neurônios primários do córtex de animais SHR



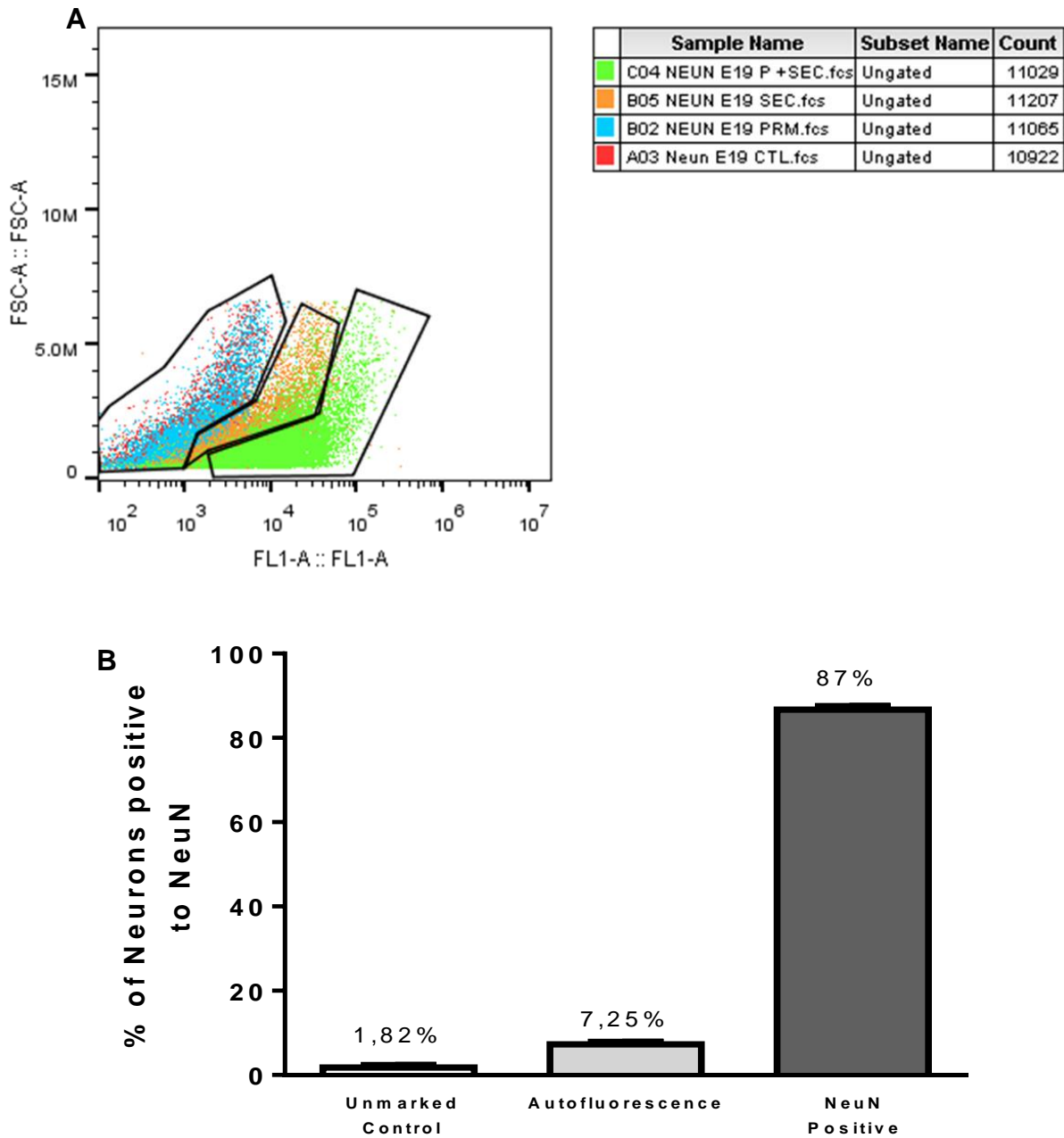
**Legenda:** Imunofluorescência foi realizada com anticorpo MAP2 para marcação de neurônios maduros 1:500 (verde) e DAPI para a marcação do núcleo celular 1:10.000 (azul). Imagens adquiridas com a objetiva de 40x (escala de 50 µM). (A) Representação da imunofluorescência com DAPI, (B) Representação da imunofluorescência com MAP2, e (C) Representação do *merge* entre o DAPI e o MAP2.

**Figura 21:** Gráfico de barras representativo da imunomarcação dos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda** (A) gráfico representativo da caracterização dos neurônios Wistar. (B) gráfico representativo da caracterização dos neurônios SHR. Imunomarcação com o anticorpo MAP2 na concentração de 1:500 (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e normalizados pela quantidade total da marcação nuclear com DAPI (1:10.000).

**Figura 22:** Representação gráfica da caracterização da cultura primária de neurônios por citometria de fluxo



**Legenda** Foi utilizado o anticorpo NeuN (1:500) e 10 mil células por condição. (A) gráfico da citometria apresentado por *forward scatter / fluorescence channel*, onde vermelho representa a situação sem marcação. A cor azul representa a fluorescência das células marcadas com o anticorpo primário (NeuN – 1:250). A cor laranja representa a fluorescência das células marcadas com o anticorpo secundário (*alexafluor* 594 – 1:750) ou autofluorescência. A cor verde representa a fluorescência das células marcadas com o anticorpo primário (NeuN) e secundário (*alexafluor* 594). (B) gráfico de barras representativo da porcentagem de células para cada condição, sem marcação, fluorescência apenas do anticorpo secundário, e marcação positivas para NeuN.

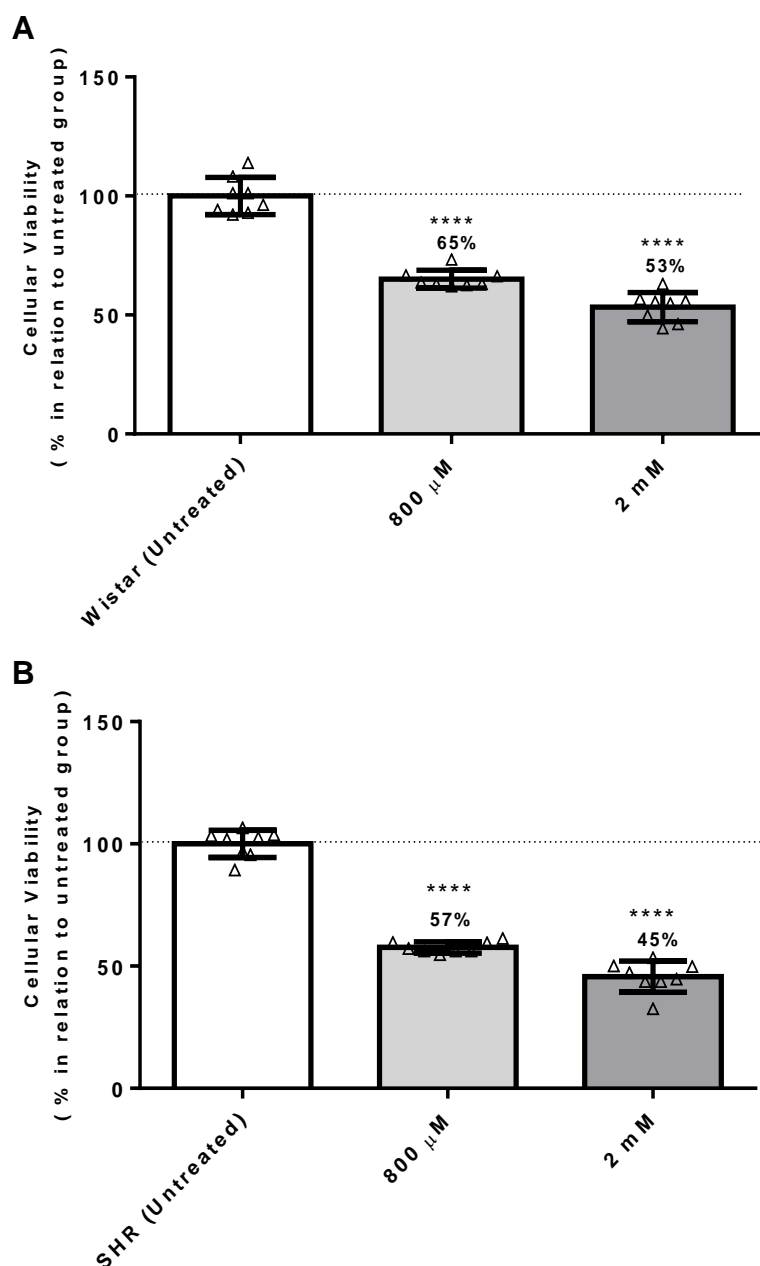
### **3.2.3 Viabilidade celular frente a hipóxia e moduladores de SIRTs**

Após observarmos que majoritariamente nossa cultura primária era composta de neurônios, realizamos os experimentos de viabilidade pelo teste de MTT com o indutor químico de hipóxia, o  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu\text{M}$  e 2 mM, 24 horas). Também realizamos o teste de viabilidade com a cultura de neurônios submetidos aos tratamentos com os moduladores de SIRTs nas concentrações previamente testadas, NAM 25 e 50  $\mu\text{M}$ , Rsv 0.25 e 0.5  $\mu\text{M}$  e Sir 2.5 e 5  $\mu\text{M}$ .

Como pode ser visto abaixo, os resultados demonstram uma redução da viabilidade dose dependente nos neurônios controle (Wistar) de 35 e 47% após a exposição a hipóxia química moderada e intensa, respectivamente (Figura 23 A). O mesmo acontece nos neurônios SHR, onde o  $\text{CoCl}_2$  reduz a viabilidade em 43 e 55% (Figura 23 B).

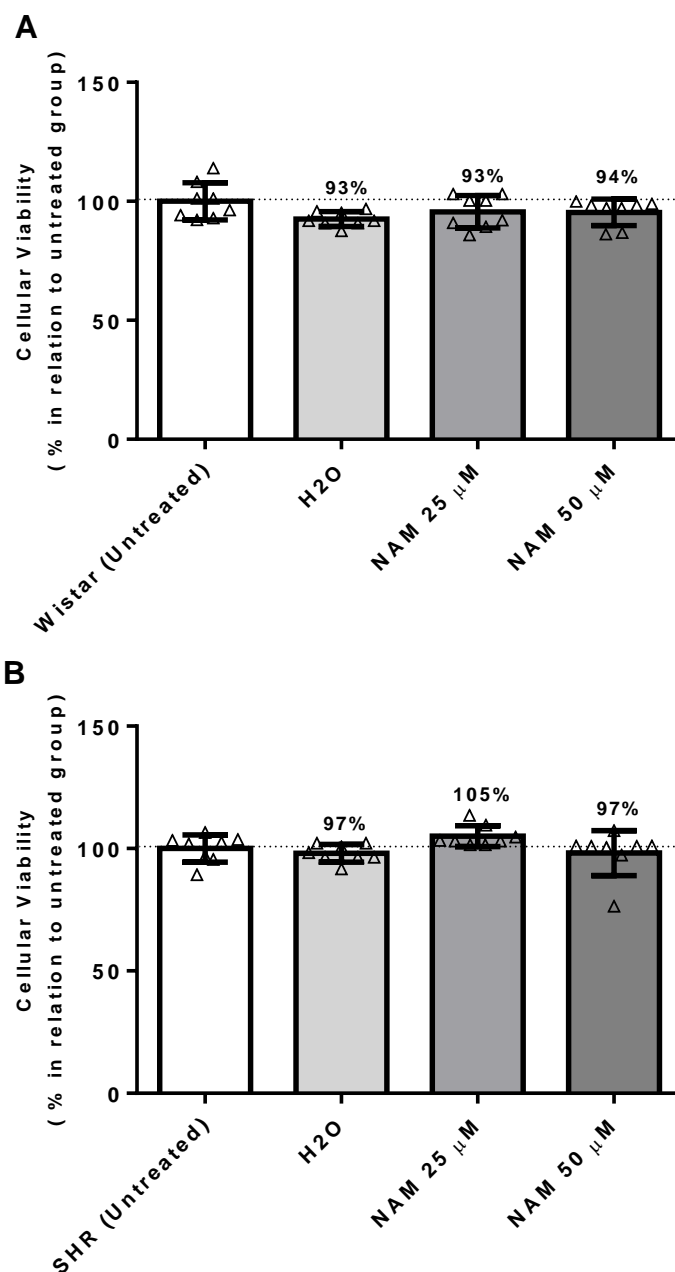
No que diz respeito aos moduladores de SIRTs, podemos observar que a NAM não reduziu a viabilidade dos neurônios de animais Wistar e SHR (Figura 24 A e B). Já no tratamento com Rsv, apenas a concentração mais alta de 0.5  $\mu\text{M}$  diminuiu significativamente a viabilidade dos neurônios em controle (Wistar) em 23% em relação ao grupo sem tratamento. No caso dos SHR, o Rsv reduziu de forma significativa a viabilidade nas duas concentrações de 0.25 e 0.5  $\mu\text{M}$  em relação ao grupo sem tratamento (Figura 25 A e B). O tratamento com o Sir reduziu a viabilidade de forma significante após o tratamento com a dose menor e maior, apenas nos neurônios SHR, sendo 22% e 35% em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*) (Figura 26 A e B).

**Figura 23:** Viabilidade celular dos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR frente ao tratamento com o indutor químico de hipóxia, cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) nas concentrações de 800 μM e 2 mM por 24 horas



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo do teste de MTT em neurônios Wistar e, (B) gráfico de barras representativo do teste de MTT em neurônios SHR. Dados representados em média ± desvio padrão e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação ao grupo sem tratamento.

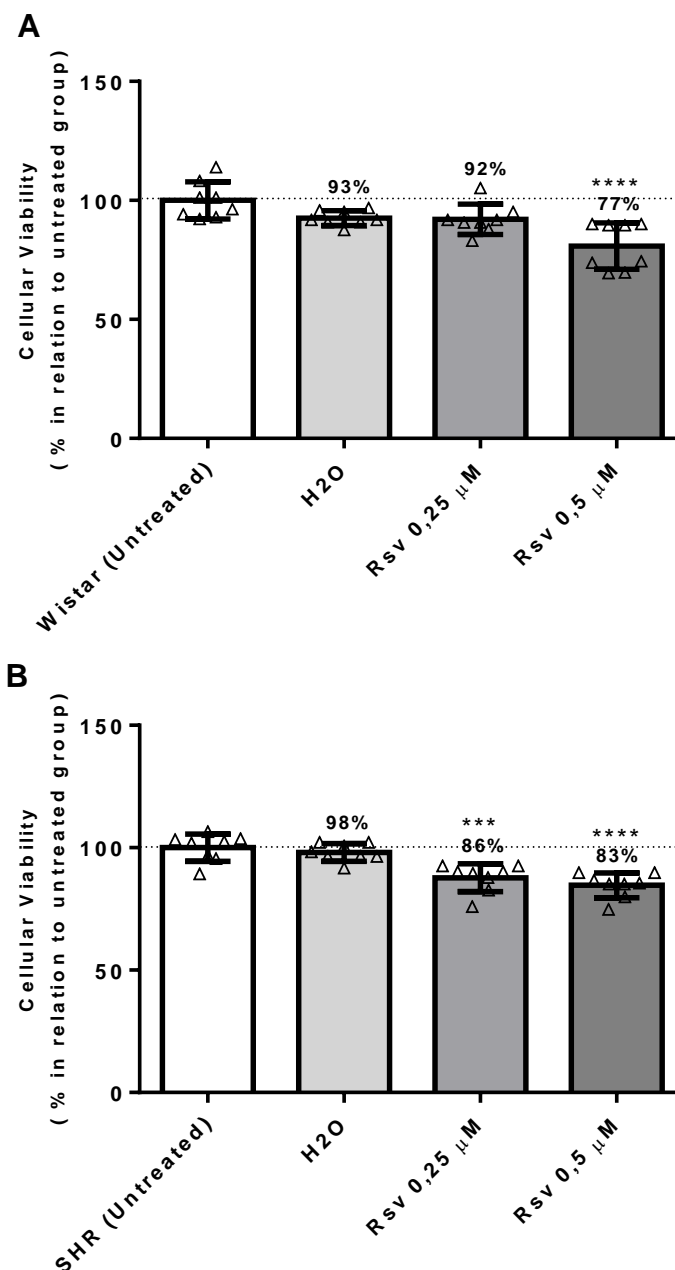
**Figura 24:** Viabilidade celular dos astrócitos primários do córtex de animais Wistar (controle) e SHR frente ao tratamento com o modulador NAM por 48 horas



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Nicotinamida (NAM) nas concentrações de 25 e 50  $\mu$ M em neurônios Wistar. (B) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Nicotinamida (NAM) nas concentrações de 25 e 50  $\mu$ M em neurônios SHR (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . Sem significância estatística entre os grupos

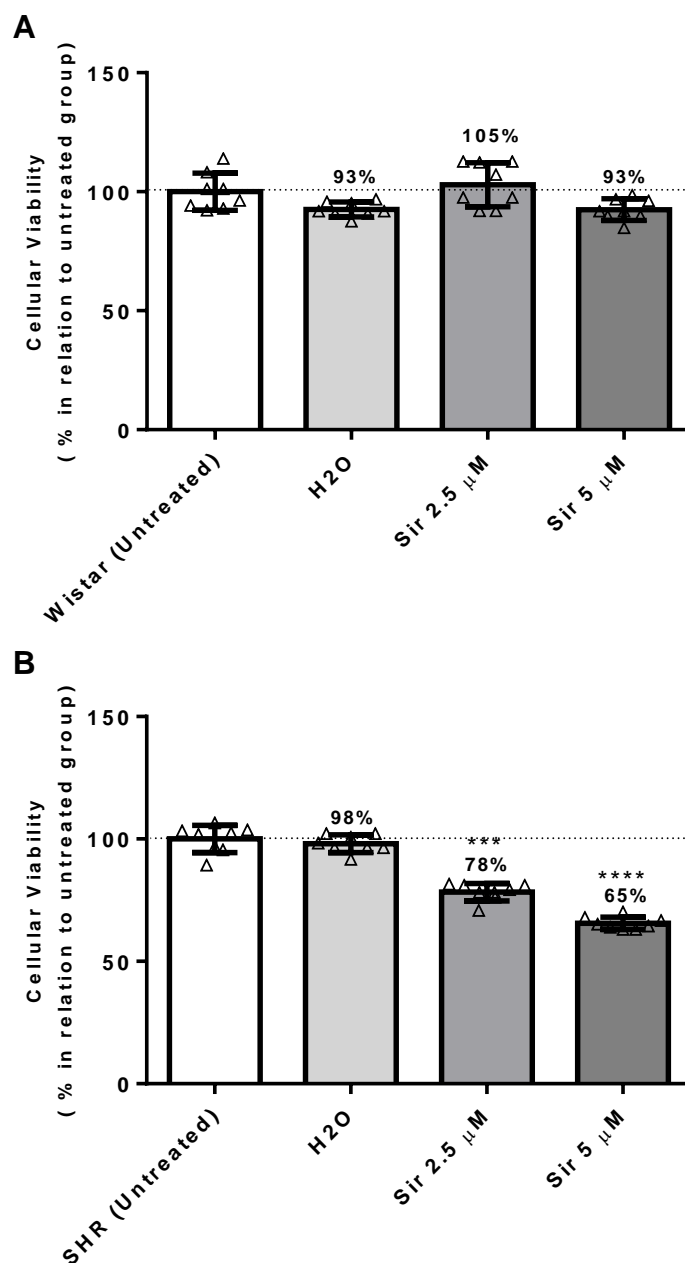


**Figura 25:** Viabilidade celular dos astrócitos primários do córtex de animais Wistar (controle) e SHR frente ao tratamento com o modulador Rsv por 48 horas



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Resveratrol (Rsv) nas concentrações de 0.25 e 0.5 μM em neurônios Wistar. (B) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Resveratrol (Rsv) nas concentrações de 0.25 e 0.5 μM em neurônios SHR (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média ± desvio padrão e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR).

**Figura 26:** Viabilidade celular dos astrócitos primários do córtex de animais Wistar (controle) e SHR frente ao tratamento com o modulador Sir por 48 horas



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Sirtinol (Sir) nas concentrações de 2.5 e 5  $\mu$ M em neurônios Wistar. (B) gráfico de barras representativo do teste de MTT após o tratamento com Sirtinol (Sir) nas concentrações de 2.5 e 5  $\mu$ M em neurônios SHR (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR).

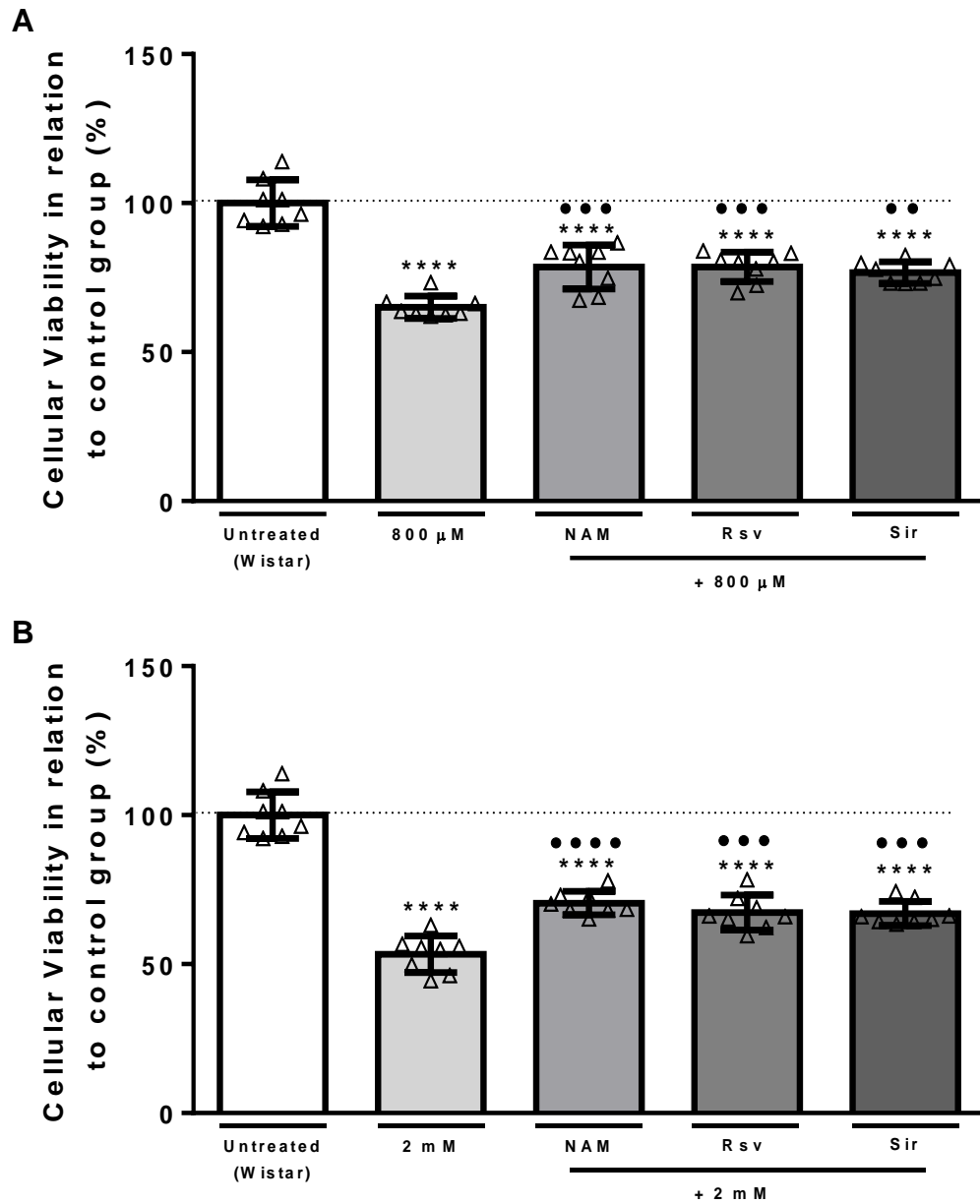
### **3.2.3.1 Viabilidade celular: Hipóxia química versus moduladores de sirtuínas**

Com o intuito de observar se os moduladores conseguiram amenizar a redução de viabilidade causada pela hipóxia nos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR, foi realizado o tratamento prévio com NAM (50  $\mu\text{M}$ ), Rsv (0.5  $\mu\text{M}$ ) e Sir (2.5  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas. Após as primeiras 24 horas, as células foram expostas a hipóxia química ( $\text{CoCl}_2$ ) nas concentrações de 800  $\mu\text{M}$  e 2 mM.

Os nossos resultados demonstraram que o tratamento prévio com NAM, Rsv e Sir foram capazes de proteger significativamente os neurônios Wistar da perda de viabilidade causada pela hipóxia química moderada (Figura 27 A) e intensa (Figura 27 B). Entretanto, nenhum deles restaurou a viabilidade a níveis basais.

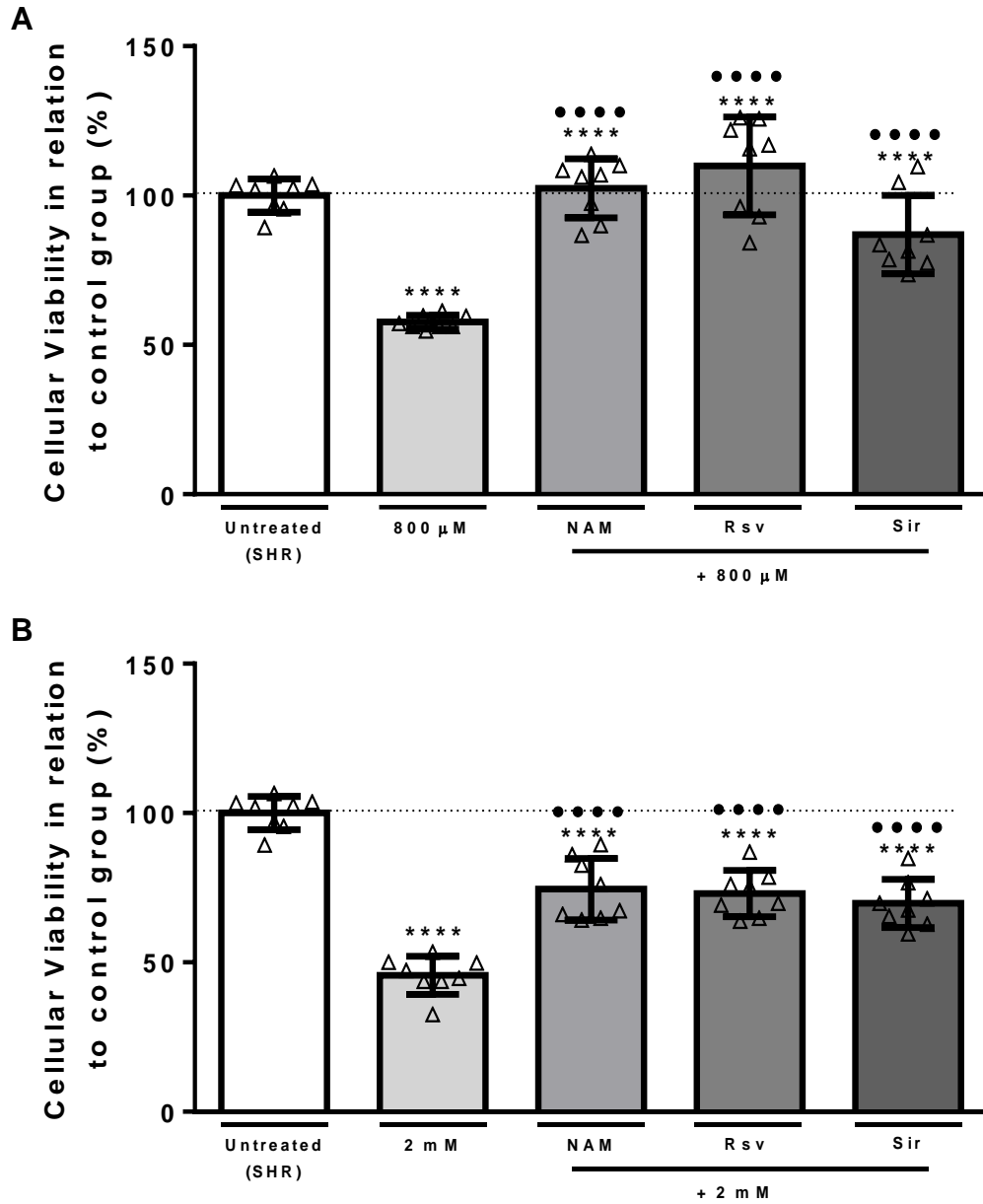
No caso dos SHR, o tratamento prévio com os moduladores NAM e Rsv foi capaz de neutralizar a queda da viabilidade causada pela hipóxia moderada, enquanto o tratamento prévio com Sir protegeu os neurônios da queda da viabilidade induzida por hipóxia de forma significativa (Figura 28 A). Quando os neurônios SHR foram previamente tratados com os moduladores e expostos a hipóxia intensa, vemos, também, que todos geraram uma proteção significativa (Figura 28 B). Esses dados demonstram que os compostos, nas doses e tempo de tratamento propostos geram uma neuroproteção.

**Figura 27:** Viabilidade celular dos neurônios primários do córtex de animais Wistar frente a exposição de moduladores de SIRT e hipóxia



**Legenda:** Foram utilizados, como moduladores, NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) ao longo de 48 horas. A hipóxia foi induzida com  $\text{CoCl}_2$  por 24 horas; hipóxia química moderada (800  $\mu$ M). (A) gráfico de barras representativo das análises de MTT com os astrócitos expostos a hipóxia moderada, e (B) Gráfico de barras representativo das análises de MTT com os astrócitos expostos a hipóxia intensa (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão, e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao grupo sem tratamento. •• $p < 0.001$ , ••• $p < 0.0001$  e •••• $p < 0.00001$  em relação ao grupo exposto somente a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM).

**Figura 28:** Viabilidade celular dos neurônios primários do córtex de animais SHR frente a exposição de moduladores de SIRT6 e hipóxia



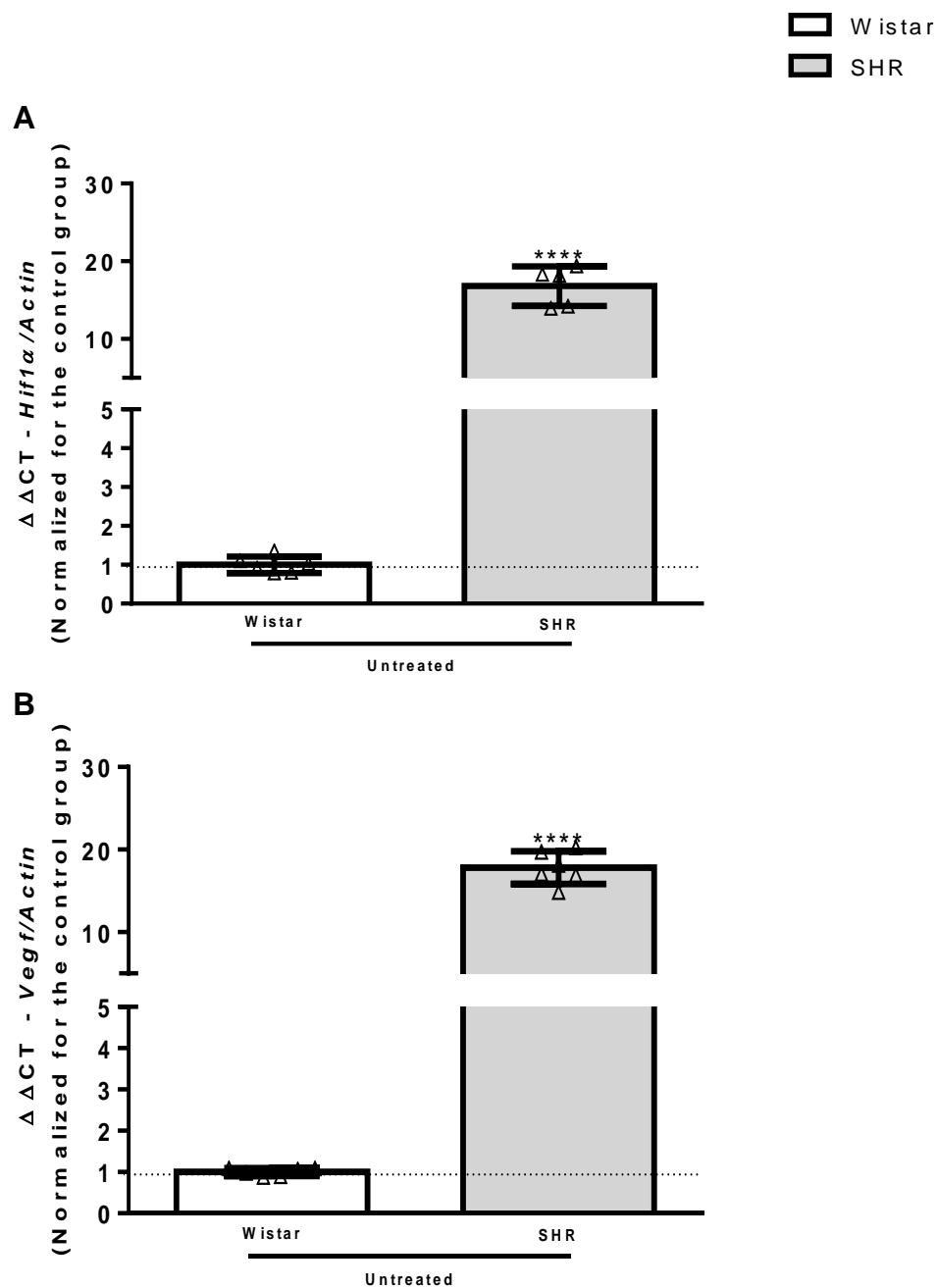
**Legenda:** Foram utilizados, como moduladores, NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) ao longo de 48 horas. A hipóxia foi induzida com  $\text{CoCl}_2$  por 24 horas; hipóxia química moderada (800  $\mu$ M). (A) gráfico de barras representativo das análises de MTT com os astrócitos expostos a hipóxia moderada, e (B) Gráfico de barras representativo das análises de MTT com os astrócitos expostos a hipóxia intensa (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão, e em porcentagem do grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao grupo sem tratamento. \*\*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação ao grupo exposto somente a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM).

### **3.2.4 Modelo celular de hipóxia química - qPCR**

Em primeiro lugar, verificamos a expressão dos genes alvo nos neurônios SHR sem tratamento (*Untreated*) em relação ao grupo controle (Wistar) sem tratamento. Como observamos nos astrócitos em E Silva et al, 2019, os neurônios SHR sem nenhum tratamento apresentam um aumento significativo da expressão de *Hif1α* e *Vegf* em comparação com os neurônios controle (Wistar) (Figura 29 A e B) indicando que a via da hipóxia está ativa nesses neurônios primários do córtex *in vitro*.

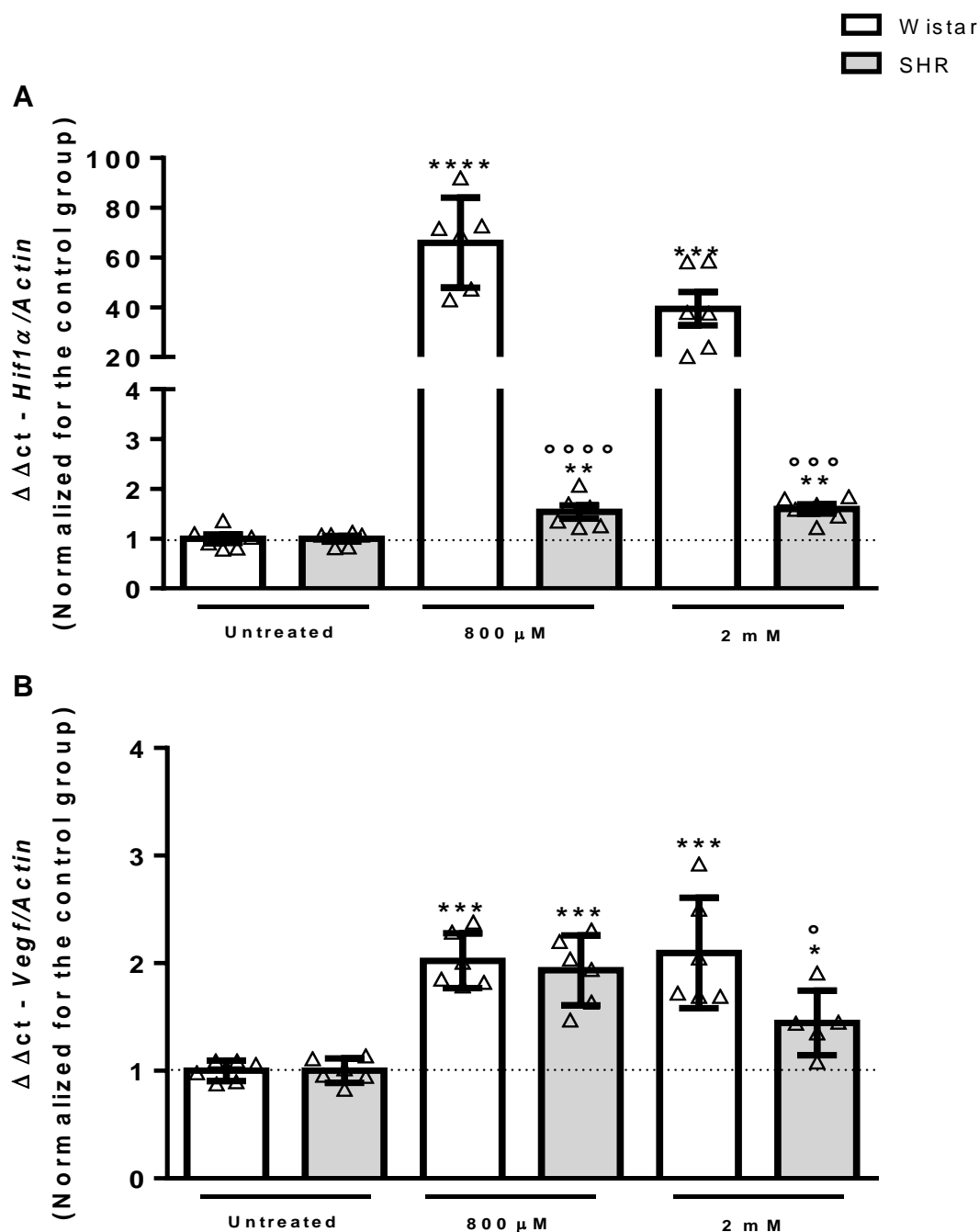
No entanto, para saber se o  $\text{CoCl}_2$  era capaz de ativar a via da hipóxia nos neurônios primários do córtex de animais Wistar, bem como aumentar a expressão dos fatores da hipóxia nos neurônios SHR, as células foram tratadas com o  $\text{CoCl}_2$  por 24 horas. Podemos observar que os tratamentos propostos com  $\text{CoCl}_2$  induzem o aumento significativo da expressão do *Hif1α* e *Vegf* nos neurônios controle (Wistar) e SHR (Figura 30 A e B). Vale mencionar que o efeito foi muito maior nos neurônios Wistar. Entretanto, em ambos os casos, não observamos diferenças significativas na expressão entre as duas doses propostas. Assim, nosso tratamento com  $\text{CoCl}_2$  também era capaz de mimetizar uma condição de hipóxia química nos neurônios primários do córtex.

**Figura 29:** Expressão de genes relacionados com a via da hipóxia em neurônios SHR sem tratamento



**Legenda:** Expressão dos genes *Hif1α* (A) e *Vegf* (B) nos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR sem tratamento. Gráficos de barras representativo (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão, e em porcentagem do grupo controle (Wistar) sem tratamento. Análise estatística foi feita por teste *T de student*. Foi considerado estatisticamente significante  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao respectivo grupo controle (Wistar) sem

**Figura 30:** Expressão dos genes *Hif1 $\alpha$*  e *Vegf* nos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR após a exposição ao indutor químico de hipóxia, cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) por 24 horas nas concentrações de 800  $\mu\text{M}$  e 2 mM



**Legenda.** (A) gráfico de barras representativo da expressão do gene *Hif1 $\alpha$*  e, (B) gráficos de barras representativo da expressão do gene *Vegf* (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento. Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA e teste post hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ . \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); ° $p < 0.01$ , °° $p < 0.001$  e °°° $p < 0.0001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

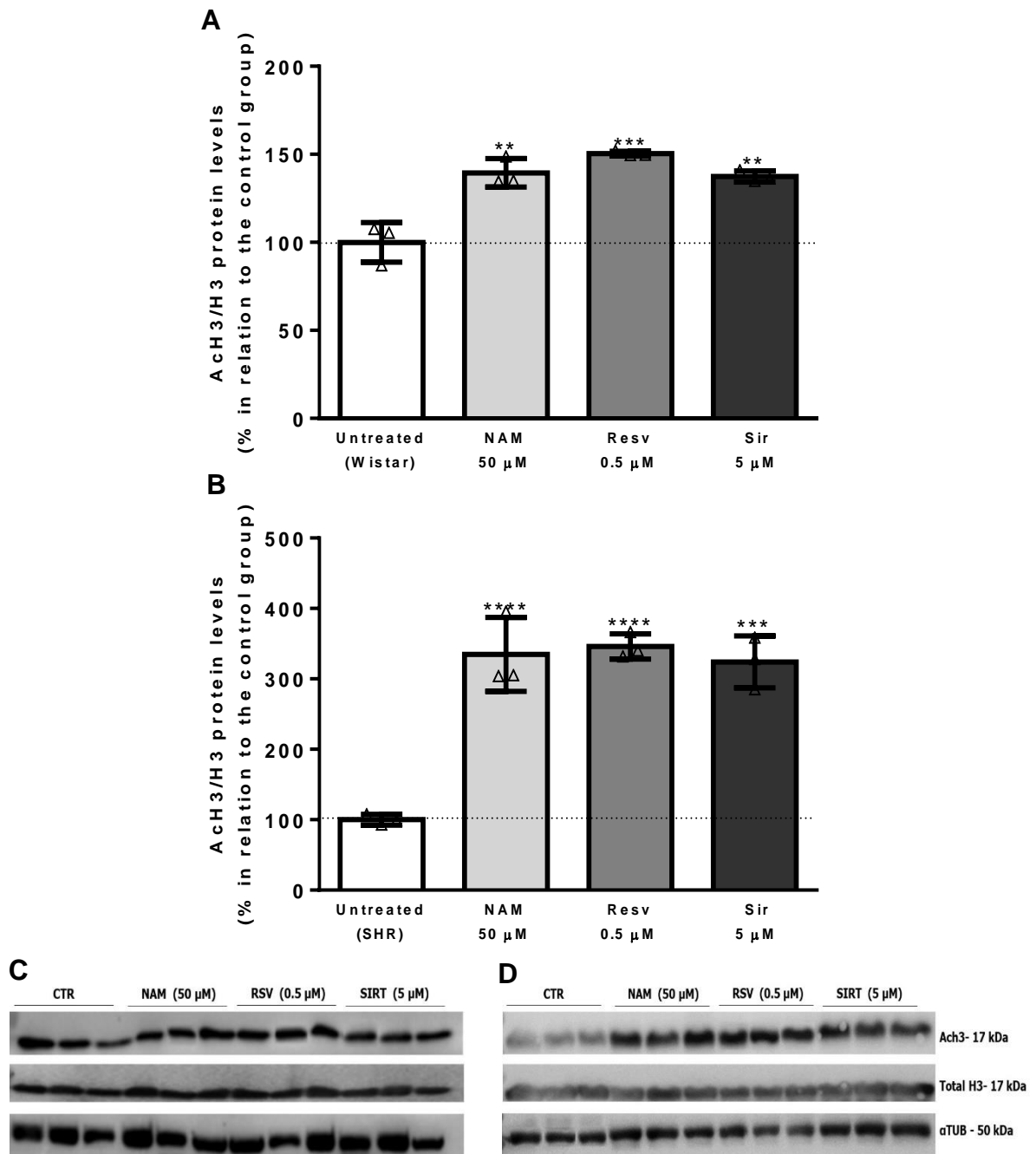


### **3.2.5 Investigação da modificação epigenética – Western-Blot**

Assim como nos experimentos com os astrócitos, nós verificamos se os moduladores, nas doses e tempo de tratamentos propostos, eram capazes de modular a ação das SIRT6. Para tal, foi utilizada novamente, a técnica de Western-Blot (ver seção, 2.8) para investigar os níveis de H3K9ac em relação aos níveis de H3K9 total.

Podemos observar que o tratamento com NAM, Rsv e Sir foram capazes de inibir o papel deacetilador das SIRT6 significativamente nos neurônios Wistar e SHR (Figura 31 A, B, C e D). Nesse sentido, a H3K9 permaneceu acetilada, o que gera uma possibilidade maior dos genes presentes nessa região serem transcritos, melhorando a capacidade celular.

**Figura 31:** Nível de acetilação da H3K9 em astrócitos primários do córtex de animais controle (Wistar) e SHR



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo das análises com neurônios Wistar expostos as concentrações de NAM 50  $\mu$ M, Rsv 0.5  $\mu$ M e Sir 5  $\mu$ M. (B) gráfico de barras representativo das análises com neurônios SHR expostos as concentrações de NAM 50  $\mu$ M, Rsv 0.5  $\mu$ M e Sir 5  $\mu$ M. (C e D) membranas do western-blot das análises com Wistar e SHR, respectivamente (N = 3). Análise estatística foi realizada por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ . \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação ao grupo sem tratamento.

### **3.2.6 Investigação do metabolismo mitocondrial entre animais controle (Wistar e SHR) – estudo funcional**

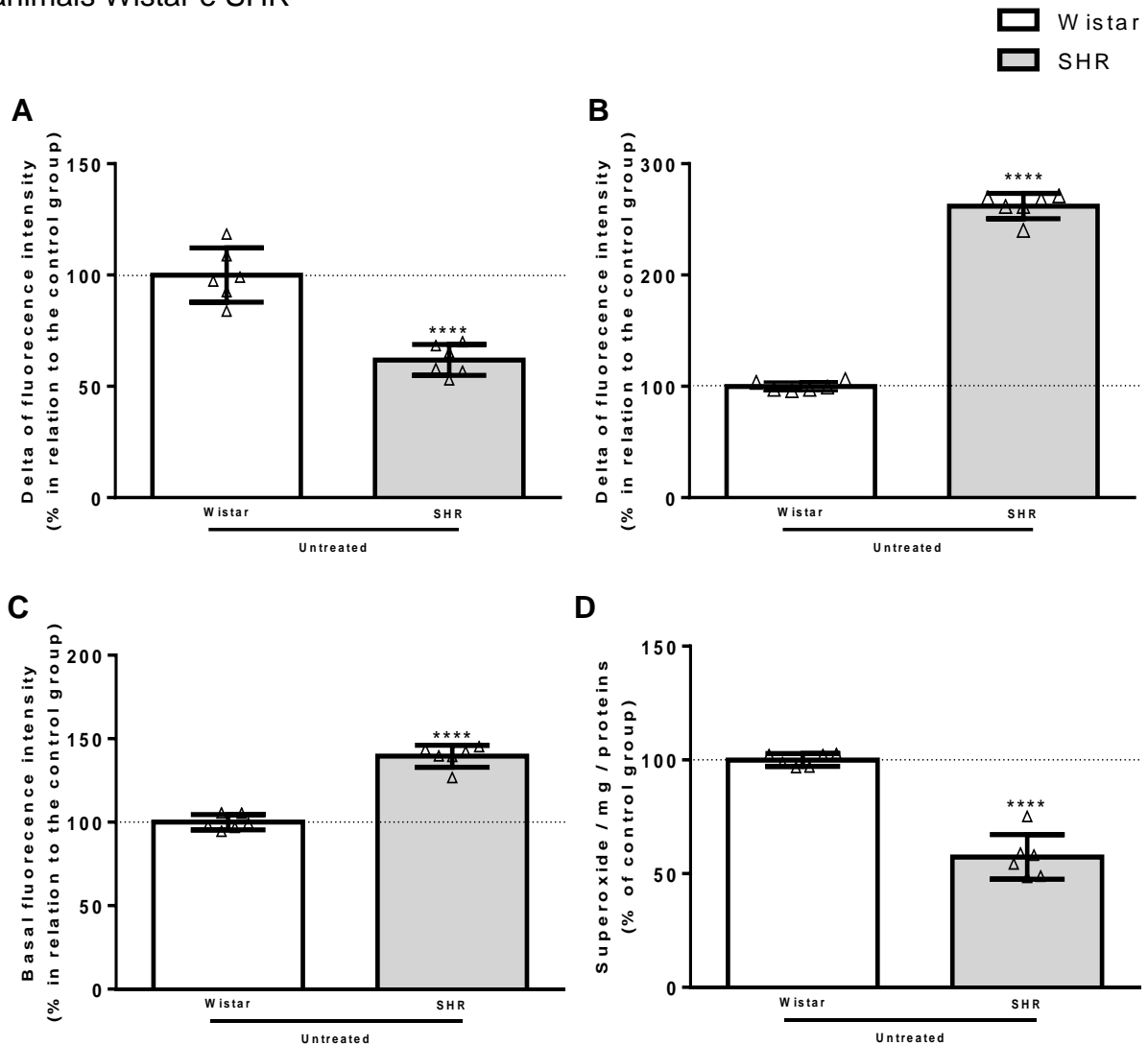
Nessa seção demonstraremos os resultados das análises do metabolismo mitocondrial. Em primeiro lugar, apresentaremos as diferenças observadas entre os grupos de neurônios controle (Wistar) e expostos a hipóxia neonatal (SHR). Nesse caso, iremos fazer uma seção especial (3.2.6.1) contendo todas as análises da função mitocondrial começando pela homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ , seguindo para o potencial de membrana mitocondrial (MMP), níveis de ROS e de superóxido mitocondrial. Ainda, demonstraremos os resultados da peroxidação lipídica (3.2.6.2), dos compostos altamente energéticos (3.2.6.3) e da expressão de genes responsáveis pelo metabolismo e dinâmica mitocondrial (3.2.6.4). Nesse caso, as comparações serão feitas em relação ao grupo Wistar sem tratamento (*Untreated*).

#### **3.2.6.1 Homeostase de $\text{Ca}^{2+}$ , potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS gerais e superóxido mitocondrial**

Podemos observar na Figura 32 A, que o delta ( $\Delta$ ) da fluorescência do Fluo-3-AM é significativamente menor nos neurônios SHR, após a indução com FCCP (5  $\mu\text{M}$ ), o que indica uma redução na capacidade de retenção do cálcio das mitocôndrias submetidas a hipóxia neonatal. No caso da Figura 32 B, que é a análise do MMP, vemos que o  $\Delta$  da fluorescência do TMRE é significativamente maior, após o FCCP (5  $\mu\text{M}$ ) nos neurônios SHR. Esse resultado poderia indicar que suas mitocôndrias estão polarizadas. Entretanto, nós observamos o mesmo dado nos astrócitos em E Silva et al., 2019 e propomos que o sinal elevado seria porque as células desses animais teriam mais mitocôndrias (ver seção 3.2.6.4).

Em relação às espécies reativas de oxigênio, vemos na Figura 32 C, que os neurônios expostos a hipóxia neonatal (SHR) apresentaram um sinal elevado do DCF, o que indica que nesses neurônios há a formação de mais ROS. Entretanto, quando analisamos os níveis de superóxido, vemos que há uma diminuição significativa do sinal. Esse dado pode refletir a própria situação de hipóxia, uma vez que nesse estado, as células inibem a OXPHOS, o que diminuiria os níveis de superóxido mitocondrial, porém facilitaria o escape de elétrons e, como consequência, aumentaria os níveis de ROS.

**Figura 32:** Análises da função mitocondrial entre neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR

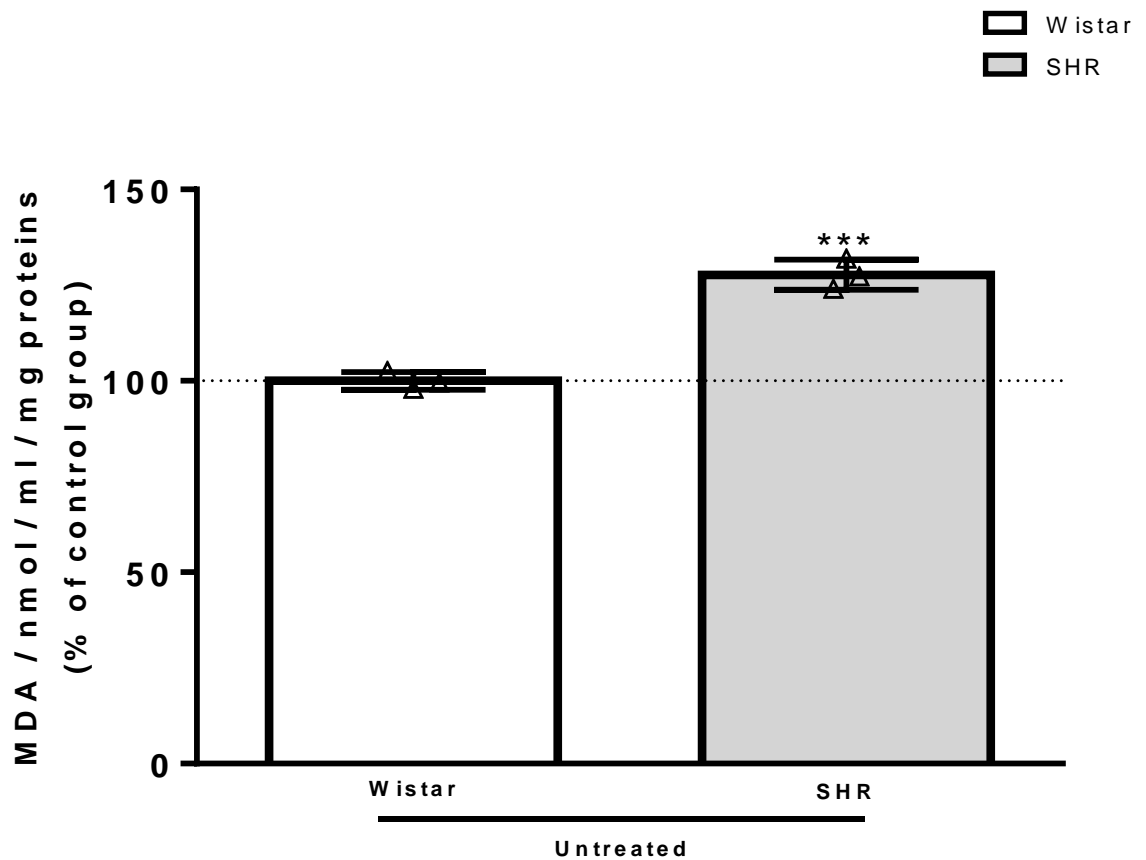


**Legenda:** (A) gráfico de barra representativo da análise de liberação de cálcio mitocondrial. (B) gráfico de barras representativo da análise de potencial de membrana mitocondrial. (C) gráfico de barras representativo da análise dos níveis de ROS gerais. (D) gráfico de barras representativo da análise dos níveis de superóxido mitocondrial. Os gráficos A e B representam o delta ( $\Delta$ ) da intensidade de fluorescência (FCCP; 5  $\mu$ M). O gráfico C demonstra a fluorescência basal e o gráfico D é o nível de superóxido normalizado pela mg de proteína de cada amostra (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo controle (Wistar). Análise estatística foi feita por teste t de *student*. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.00001$ , em relação ao respectivo grupo controle Wistar.

### **3.2.6.2 Análise da peroxidação lipídica**

Como verificamos que os neurônios expostos à hipóxia neonatal possuíam níveis elevados de ROS gerais, fomos investigar a peroxidação lipídica, que é uma das possíveis consequências do aumento dos níveis de ROS. Para tal, foi quantificado o nível de malondialdeído (MDA). Podemos observar que houve um aumento significativo do sinal fluorescente do MDA em relação ao grupo controle (Wistar), um indicativo de que, de fato, estava ocorrendo peroxidação lipídica nos neurônios expostos a hipóxia neonatal (Figura 33).

**Figura 33:** Análise dos níveis de malondialdeído (MDA) entre neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR sem tratamento



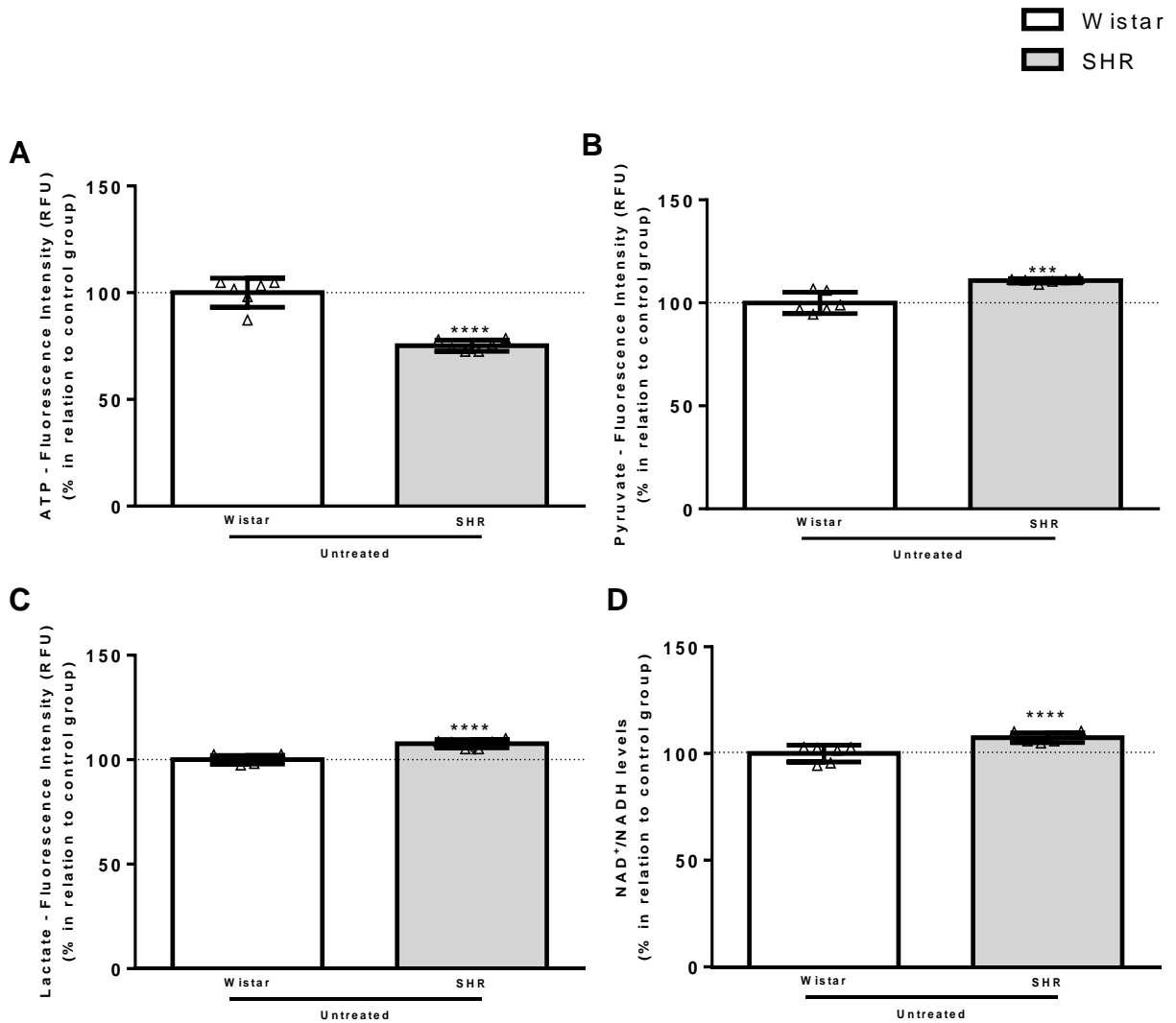
**Legenda:** Gráfico de barras representativo da análise dos níveis de MDA/nmol/ml normalizado pela mg de proteínas de cada amostra (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo controle (Wistar). Análise estatística foi feita por teste t de *student*. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\* $p < 0.0001$ , em relação ao respectivo grupo controle Wistar.

### **3.2.6.3 Avaliação dos níveis dos compostos altamente energéticos**

A fim de verificar se essas alterações na função mitocondrial causadas pela hipóxia neonatal refletiram em alterações nos compostos celulares altamente energéticos, foram avaliados os níveis de, ATP, piruvato, lactato e da razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .

De forma interessante, nossos dados revelaram que os neurônios SHR possuem significativamente menos ATP do que os Wistar (Figura 34 A). Porém, possuem níveis elevados de piruvato, lactato e  $\text{NAD}^+$  (Figura 34 B, C e D). Esses achados podem estar relacionados a própria exposição à hipóxia, uma vez que nessa situação, com a inibição da OXPHOS, gera-se menos ATP. Da mesma forma, há um estímulo da glicólise fomentando a formação de piruvato. Ainda, a hipóxia impulsiona a conversão de piruvato em lactato, o que regenera  $\text{NAD}^+$  proporcionando substrato para que a glicólise continue a funcionar (Fuhrmann e Brune, 2017). Nesse sentido, os neurônios primários do córtex de animais SHR apresentaram um aumento do metabolismo basal glicolítico (Figura 34 A, B, C e D).

**Figura 34:** Análise dos níveis de compostos de alta energia entre neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR sem tratamento



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo da análise dos níveis de ATP. (B) gráfico de barras representativo da análise dos níveis de piruvato. (C) gráfico de barras representativo da análise dos níveis de lactato. (D) gráfico de barras representativo da análise da razão NAD<sup>+</sup>/NADH (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média ± desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo controle (Wistar). Análise estatística foi feita por teste t de *student*. Foi considerado estatisticamente significativo, p<0.05. \*\*\*p<0.0001 e \*\*\*\*P<0.00001, em relação ao respectivo grupo controle Wistar.



### **3.2.6.4 Investigação do metabolismo mitocondrial – PCR em tempo real**

A situação de hipóxia neonatal nos neurônios SHR causa uma disfunção mitocondrial que induz a peroxidação lipídica e reduz os níveis de ATP. Esses fatores podem reduzir a viabilidade das células. Porém, vemos que há mais produção de piruvato, lactato e NAD<sup>+</sup>, sugerindo um aumento na glicólise.

Nesse sentido, fomos avaliar os genes que fazem parte da via da biogênese mitocondrial (*Pgc1α*, *Nrf1*, *Tfam* e *Tom20*) para verificar se esses neurônios, assim como nos astrócitos, possuem mais mitocôndrias. Avaliamos, ainda, a expressão de genes relacionados à dinâmica das mitocôndrias, para verificar se a hipóxia neonatal era capaz causar alterações nessas vias, especificamente analisamos a expressão de *Drp1* e *Fis1* para a via da fissão mitocondrial e o *Mfn2* para a via da fusão mitocondrial. Por último, verificamos a expressão de *Nfe2l2*, gene relacionado com ambos os processos de biogênese e mecanismos antioxidantes, para verificar se a hipóxia também alterava esse parâmetro.

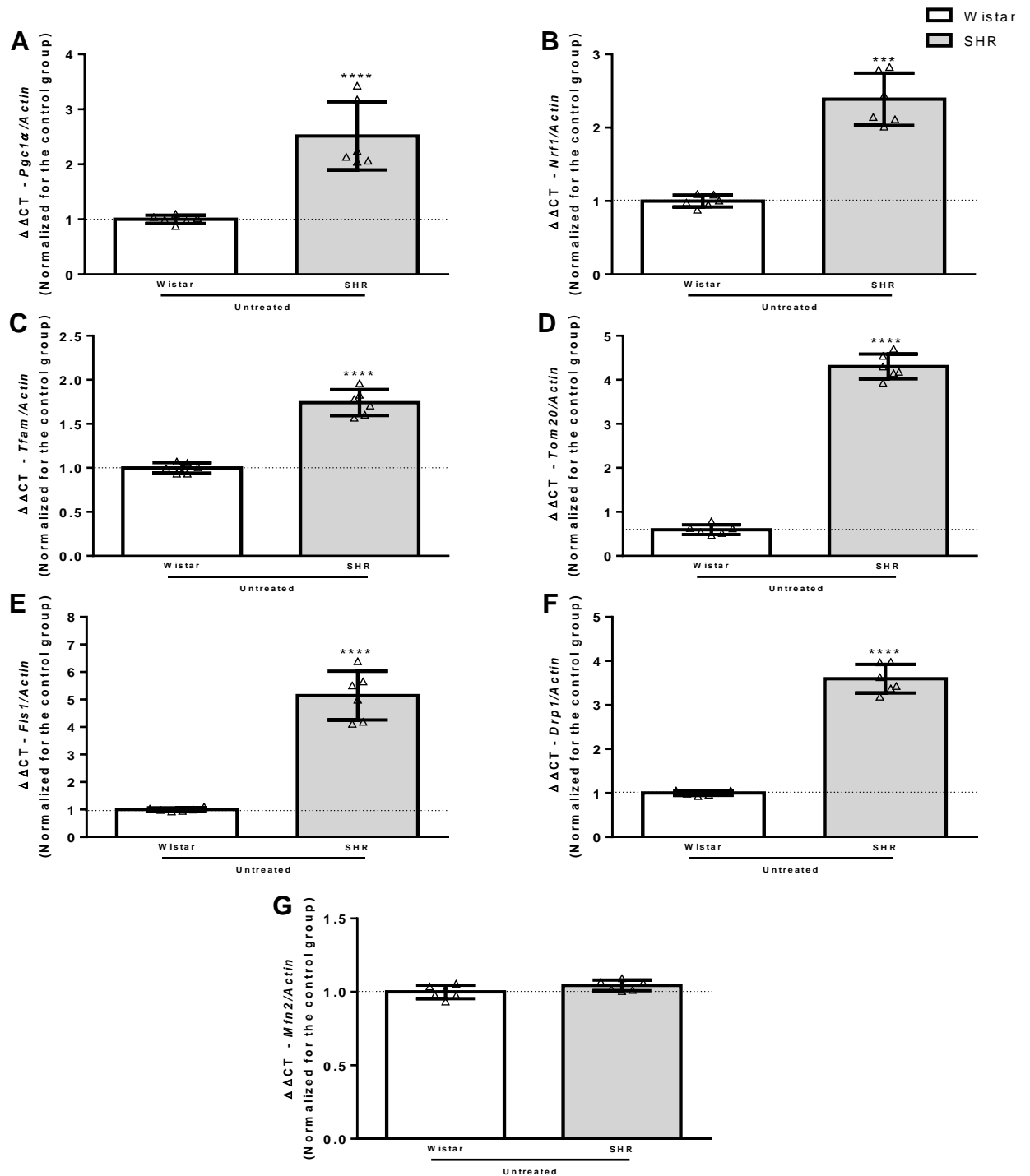
Podemos observar que os neurônios submetidos a hipóxia neonatal (SHR) tem a expressão significativamente elevada de todos os genes que atuam na via da biogênese mitocondrial em comparação com os neurônios controle (Wistar) (Figura 35 A, B, C e D). Esse dado reforça o resultado observado nas análises do MMP, em que supomos que esses neurônios poderiam ter mais mitocôndrias e que, por isso, o sinal do TMRE estaria mais alto. Não obstante, esse aumento do número de organelas poderia ser outro mecanismo compensatório contra a adaptação induzida pela hipóxia.

Quando analisamos a expressão dos genes relacionados com a fissão e fusão mitocondrial, vemos que nos neurônios SHR a fissão das mitocôndrias é estimulada, pois notamos um aumento significativo da expressão do *Fis1* e *Drp1* (Figura 35 E e F). No que diz respeito à fusão, não foram observadas alterações significativas (Figura 35 G). Nesse sentido, a fissão mitocondrial poderia ser outro mecanismo pelo qual os neurônios SHR lidam com as disfunções mitocôndrias causadas pela hipóxia, mesmo porque, a fissão é um processo que favorece a reciclagem das mitocôndrias disfuncionais.

Verificamos que a expressão do *Nfe2l2* também se encontrava significativamente elevada nos neurônios SHR (Figura 35 H); apesar do elevado nível de ROS nesses neurônios. Todos esses achados reforçam a ideia apresentada em E Silva et al., 2019, em que esses animais, por terem passado por uma situação

de hipóxia, possuem mecanismos de compensação, ou um pré-condicionamento favorecendo sua viabilidade.

**Figura 35:** Expressão dos genes relacionados a biogênese e dinâmica mitocondrial entre neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR sem tratamento



**Legenda:** (A) representação gráfica da expressão do *Pgc1α*. (B) representação gráfica da expressão do *Nrf1*. (C) representação gráfica da expressão do *Tfam*. (D) representação gráfica da expressão do *Tom20*. (E) representação gráfica da expressão do *Fis1*. (F) representação gráfica da expressão do *Drp1*. (G) representação gráfica da expressão do *Mfn2*. (H) representação gráfica da expressão do *Nfe2l2* (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo controle (Wistar). Análise estatística foi feita por teste t de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao controle (Wistar).

### **3.2.7 Investigação do metabolismo mitocondrial em animais controle (Wistar) e SHR após a hipóxia química e modulação das SIRTs – estudo funcional**

No caso dessa seção demonstraremos os resultados encontrados nas análises realizadas entre os neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR expostos a hipóxia química e submetidos ao tratamento prévio com os moduladores de SIRTs. Nesse caso, as comparações serão feitas em relação aos respectivos grupos Wistar e SHR sem tratamento (*Untreated*).

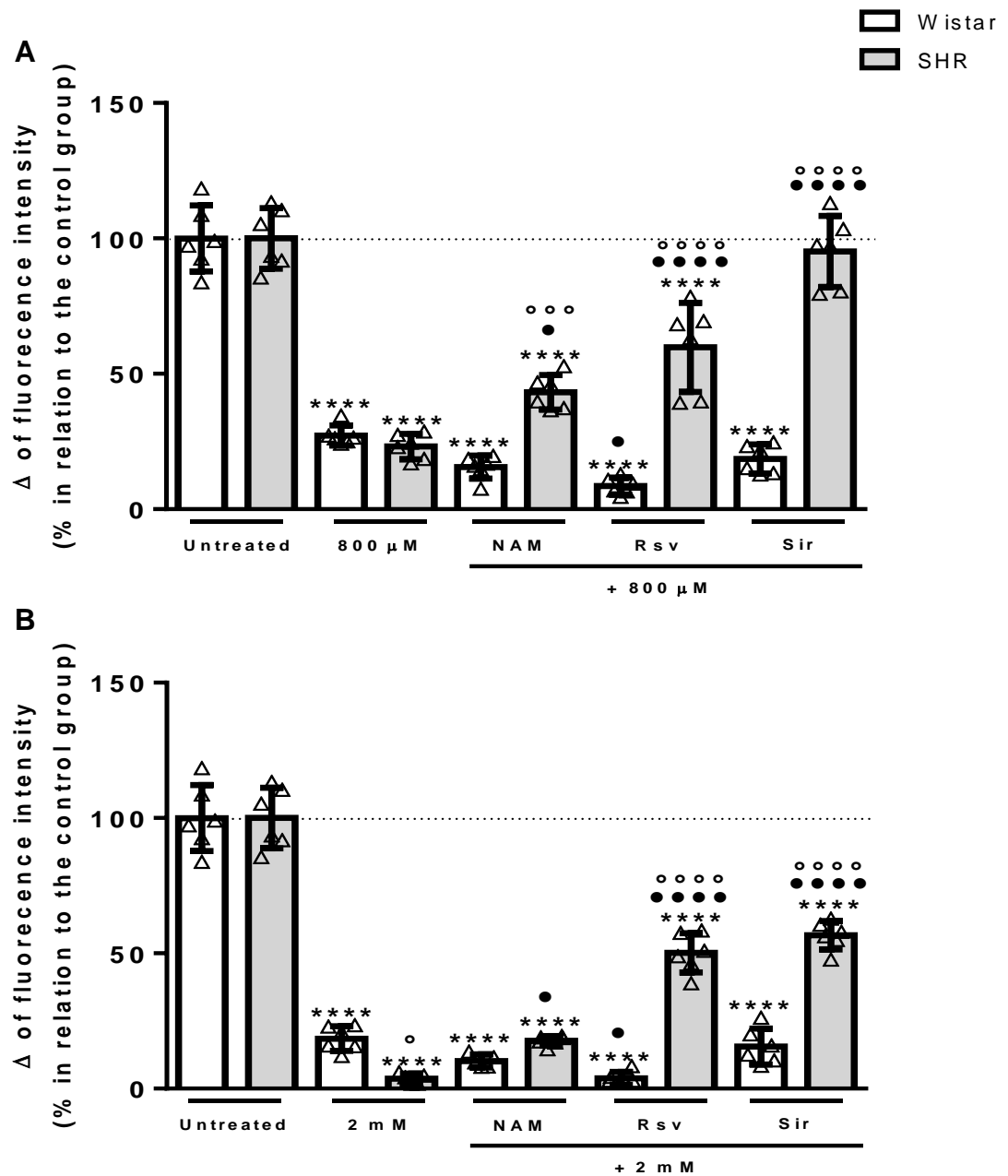
#### **3.2.7.1 Homeostase de $Ca^{2+}$**

Quando analisamos os dados após a exposição à hipóxia química moderada (800  $\mu$ M) e intensa (2 mM), vemos que há uma redução significativa da retenção de  $Ca^{2+}$  pelas mitocôndrias em ambos os tipos de neurônios (Figura 36 A e B) em relação aos respectivos grupos sem tratamento. Ainda, observa-se que na situação de hipóxia intensa, as mitocôndrias SHR captam menos o íon em relação ao grupo controle (Wistar) (Figura 36 B).

No entanto, quando os neurônios foram previamente tratados com os moduladores de SIRTs, vemos que no grupo controle (Wistar) o Rsv causa redução a captação de  $Ca^{2+}$  pelas mitocôndrias em relação ao grupo sem tratamento e ao grupo exposto somente a hipóxia. No caso, os tratamentos com o NAM e Sir não causam nenhum efeito (Figura 36 A). Entretanto, no caso dos SHR, o tratamento prévio com os moduladores fez as mitocôndrias captarem mais o  $Ca^{2+}$  de forma significativa em relação ao grupo exposto somente a hipóxia, sendo que o efeito foi mais bem observado com o tratamento prévio com Sir (Figura 36 A).

Quando os neurônios Wistar foram previamente tratados com os moduladores e expostos a hipóxia intensa (2 mM) vemos o mesmo resultado observado com a hipóxia moderada, menos retenção após o tratamento com Rsv e, nenhuma alteração com o tratamento com NAM e Sir (Figura 36 B). Ainda, o mesmo parâmetro se repetiu no caso dos neurônios SHR na mesma condição, novamente todos os moduladores aumentaram de forma significativa a retenção de  $Ca^{2+}$  pelas mitocôndrias, porém, nesse caso, o tratamento com Rsv e Sir causaram o melhor efeito (Figura 36 B). Esses resultados nos mostram que, para os neurônios SHR, o tratamento com os moduladores melhora a capacidade de retenção do  $Ca^{2+}$  que havia sido prejudicada pela hipóxia.

**Figura 36:** Liberação de cálcio mitocondrial em neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



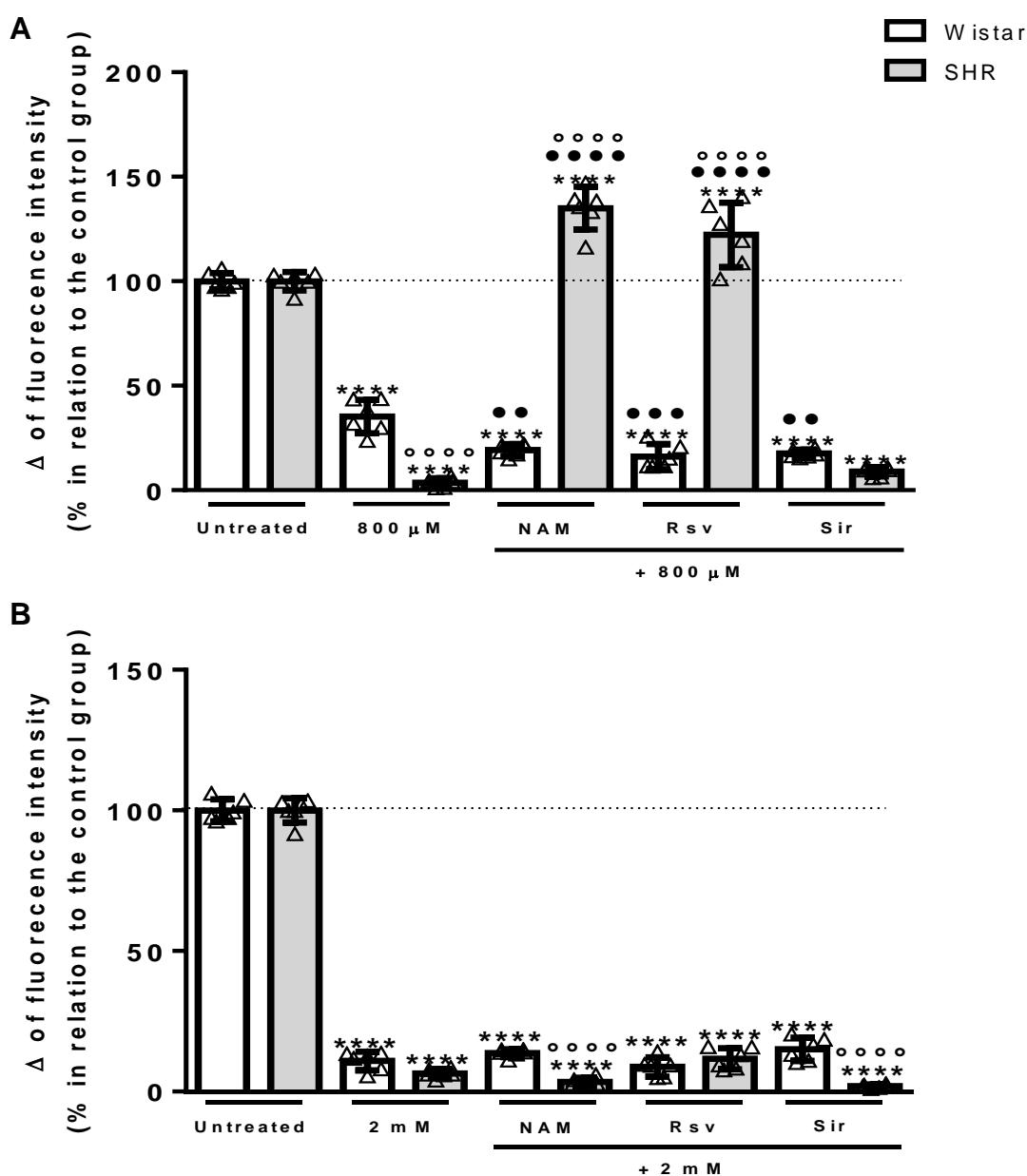
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50 μM), Rsv (0.5 μM) e Sir (5 μM) por 48 horas, e CoCl<sub>2</sub> (800 μM e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo dos níveis de cálcio citosólico após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo dos níveis de cálcio citosólico após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média ± desvio padrão, e em porcentagem do respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Os gráficos de barras representam o delta (Δ) da intensidade de fluorescência (FCCP; 5 μM). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo, p<0.05. \*\*\*\*p<0.00001, em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); •p<0.01 e \*\*\*\*p<0.00001, em relação aos grupos expostos apenas a hipoxia química (800 μM ou 2 mM); °p<0.01, °°p<0.0001 e °°°p<0.00001, em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

### **3.2.7.2 Potencial de membrana mitocondrial**

Como vimos que a situação de hipóxia moderada ou intensa causava uma alteração na capacidade de retenção mitocondrial do  $\text{Ca}^{2+}$ , fomos avaliar o potencial de membrana mitocondrial (MMP). Os resultados demonstraram que em ambas as situações de hipóxia e em ambos os neurônios analisados (Wistar e SHR) houve uma despolarização significativa do MMP (Figura 37 A e B). Após o tratamento prévio com os moduladores, vemos que nos neurônios controle (Wistar) nenhum deles conseguiu restabelecer a despolarização do MMP causada pela hipóxia moderada (Figura 37 A). Pelo contrário, causaram uma despolarização significativamente maior quando comparados com o grupo exposto somente à hipóxia. Entretanto, no caso dos neurônios SHR, vemos que o NAM e o Rsv protegem as células da despolarização causada pela situação de hipóxia moderada, enquanto o tratamento com Sir não causa nenhum efeito (Figura 37 A).

Quando ambos os neurônios (Wistar e SHR) foram previamente tratados e expostos a hipóxia intensa, nenhum dos moduladores foi capaz de restabelecer o MMP, permanecendo assim a despolarização causada pela própria hipóxia intensa (Figura 37 B). Esses dados demonstram a capacidade dos moduladores NAM e Rsv de proteger os neurônios submetidos à hipóxia neonatal da despolarização mitocondrial causada pela hipóxia química.

**Figura 37:** Despolarização da membrana mitocondrial dos astrócitos primários do córtex de animais Wistar e SHR



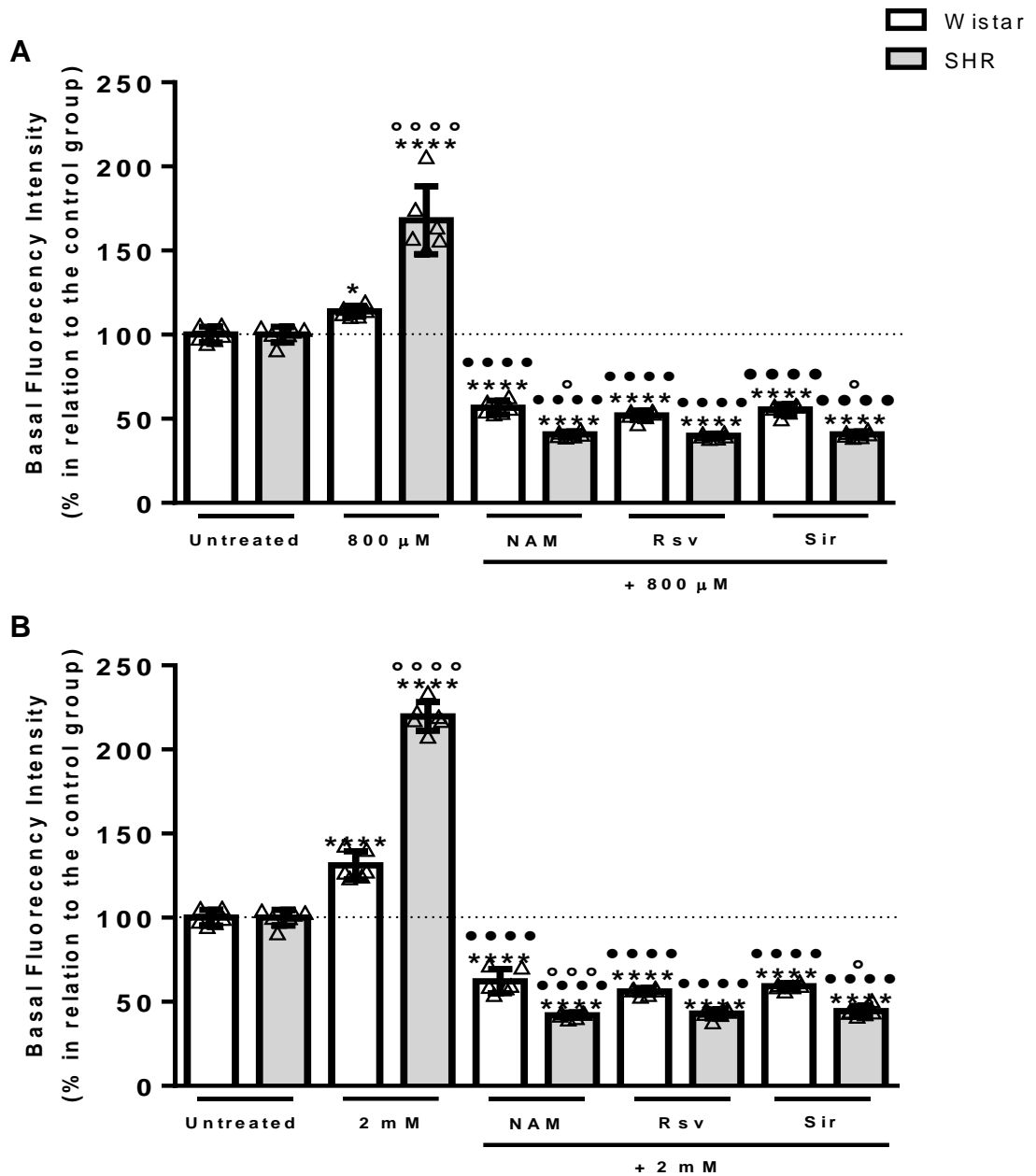
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50 μM), Rsv (0.5 μM) e Sir (5 μM) por 48 horas, e CoCl<sub>2</sub> (800 μM e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises do MMP após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo das análises do MMP após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média ± desvio padrão, e em porcentagem do respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Os gráficos de barras representam o delta (Δ) da intensidade de fluorescência (FCPP; 5 μM). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo, p<0.05. \*\*\*\*p<0.00001 em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001 e \*\*\*\*p<0.00001, em relação aos grupos expostos apenas a hipoxia (800 μM ou 2 mM); °p<0.01 e °°°°p<0.00001, em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

### **3.2.7.3 Níveis de ROS gerais**

Quando vimos que na situação sem tratamento nos neurônios SHR os níveis de DCF eram maiores em comparação com o grupo Wistar (Figura 32 C), fomos investigar se a hipóxia química causava esse efeito. Como esperávamos, ambas as situações de hipóxia aumentam os níveis de ROS gerais nos neurônios Wistar e SHR significativamente em comparação aos respectivos grupos sem tratamento (Figura 38 A e B). Verifica-se ainda que o efeito da hipóxia química nos neurônios SHR é maior e mais potente na situação de hipóxia química intensa (2 mM) (Figura 38 B). Surpreendentemente, nos casos em que os neurônios foram submetidos a hipóxia química moderada ou intensa, o tratamento prévio com os moduladores de SIRTs causou um efeito antioxidante, reduzindo significativamente os níveis de ROS gerais nos neurônios Wistar e SHR (Figura 38 A e B). Nesse caso, os moduladores exercem um efeito protetor contra o aumento dos níveis de ROS gerais impulsionado pela hipóxia química.



**Figura 38:** Avaliação dos níveis de ROS gerais e efeito antioxidante dos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



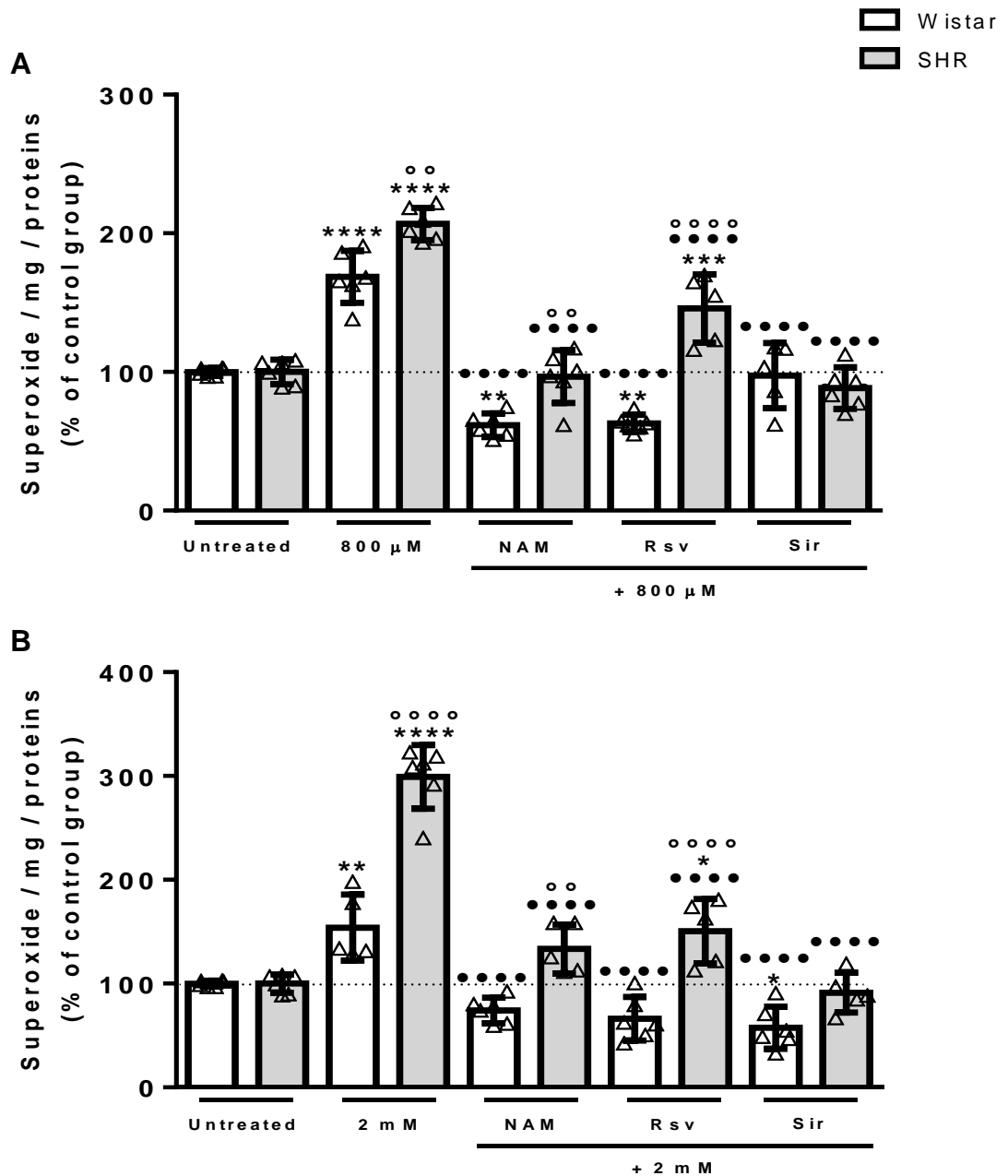
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT6, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT6 (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \* $p < 0.01$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \*\*\*\* $p < 0.00001$ , em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM); ° $p < 0.01$  e °° $p < 0.01$  e °°° $p < 0.00001$ , em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

#### **3.2.7.4 Níveis de superóxido mitocondrial**

Após verificarmos os níveis de ROS gerais, fomos investigar o quanto as mitocôndrias estavam gerando superóxido. Quando os neurônios Wistar e SHR foram submetidos a condição de hipóxia química moderada (800  $\mu$ M) ou intensa (2 mM), vemos que há um aumento significativo da geração de superóxido mitocondrial (Figura 39 A e B). Novamente o efeito da hipóxia nos SHR foi significativamente maior do que nos Wistar.

Curiosamente, nessa análise também vemos um efeito antioxidante dos moduladores de SIRT6, porém de uma forma diferente. Quando os neurônios Wistar foram previamente tratados com os moduladores de SIRT6 e expostos a hipóxia moderada (800  $\mu$ M) vemos que o NAM e Rsv reduzem a geração de superóxido quando comparados com o grupo sem tratamento e exposto somente a hipóxia. No caso do tratamento com Sir, o resultado foi significativo apenas em relação ao grupo exposto somente a hipóxia (Figura 39 A). O mesmo aconteceu nos neurônios SHR previamente tratados, todos os moduladores reduzem de forma significativa os níveis de superóxido em relação ao grupo exposto somente a hipóxia moderada (Figura 39 A). Já no caso da exposição à hipóxia intensa, todos os moduladores protegem significativamente os neurônios Wistar da geração de superóxido em relação ao grupo exposto somente à hipóxia. Nesse caso, o Sir exerce o melhor efeito (Figura 39 B). No caso dos SHR vemos, também, que o tratamento prévio com todos os moduladores de SIRT6 previnem a geração de superóxido impulsionado pela hipóxia química intensa (Figura 39 B). Os dados mostram, novamente, que há um potencial efeito antioxidante relacionado aos moduladores de SIRT6.

**Figura 39:** Níveis de superóxido e efeito antioxidante em neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT6, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT6 (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$ , em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); ••• $p < 0.00001$ , em relação aos grupos expostos a hipoxia (800  $\mu$ M ou 2 mM); ° $p < 0.001$  e °°° $p < 0.00001$ , em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

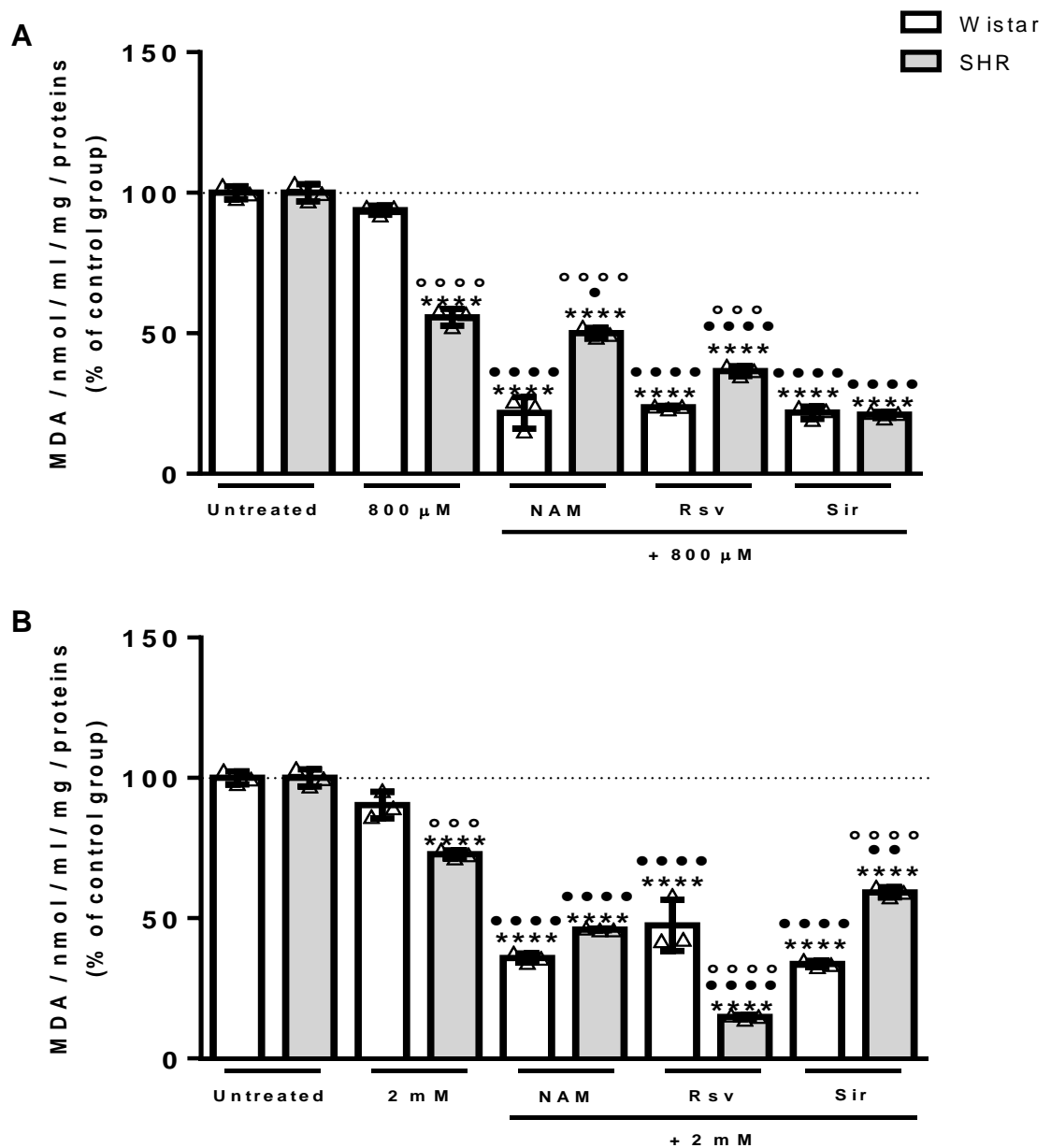
### **3.2.7.5 Avaliação da peroxidação lipídica**

Como vimos que os níveis de MDA estavam elevados nos neurônios SHR sem tratamento em comparação os Wistar (Figura 33) e que a hipóxia química aumenta os níveis de ROS e superóxido, verificamos os níveis de MDA após a exposição a hipóxia química e tratamento com os moduladores. Inesperadamente, quando os neurônios Wistar foram submetidos às condições de hipóxia, os níveis de MDA não se alteraram. Já no caso dos SHR, houve uma redução significativa na quantidade de MDA em ambas as situações de hipóxia química (Figura 40 A e B).

Surpreendentemente, quando os neurônios controle (Wistar) e SHR foram previamente tratados com os moduladores de SIRT6 e expostos a hipóxia moderada (800  $\mu$ M), houve uma diminuição significativa do MDA em relação ao grupo sem tratamento e o grupo exposto à hipóxia (Figura 40 A). Aqui o efeito nos neurônios Wistar foi significativamente melhor do que nos SHR. Da mesma forma, quando os neurônios (Wistar e SHR) foram submetidos aos tratamentos e expostos a hipóxia intensa (2 mM) os níveis de MDA também ficaram significativamente menores (Figura 40 B).

Os dados sugerem que há uma redução da peroxidação lipídica sobre hipóxia química, e que, ainda, há uma prevenção quando os neurônios são previamente tratados com os moduladores de SIRT6. Ou seja, com menos ROS e superóxido, há menos estresse oxidativo e conseqüentemente menos peroxidação dos lipídeos.

**Figura 40:** Níveis de MDA em neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e CoCl<sub>2</sub> (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT6, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT6 (N = 3, em duplicatas). Dados representados em MDA/nmol/ml/mg de proteínas e em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.00001$ , em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); • $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  e \*\*\* $p < 0.00001$ , em relação aos grupos expostos a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM); °°° $p < 0.0001$  e °°°° $p < 0.00001$ , em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

### **3.2.7.6 Avaliação dos compostos altamente energéticos**

Até aqui observamos diversas alterações na função mitocondrial causadas pelas situações de hipóxia química. Vimos ainda, que sem nenhum tratamento os neurônios primários do córtex de animais SHR também manifestam essas disfunções mitocondriais. Essas disfunções levam o neurônio SHR a produzirem menos ATP e a elevarem os níveis de piruvato, lactato e  $\text{NAD}^+$  (Figura 34 A, B, C e D). Portanto, investigamos os níveis desses compostos nos neurônios controle (Wistar) e SHR após a hipóxia química moderada e intensa, bem como após o tratamento com os moduladores de SIRTos.

Os nossos dados mostram que há uma redução significativa da produção de ATP quando os neurônios Wistar e SHR são expostos a condição de hipóxia química moderada e intensa. Importante frisar que, no caso dos SHR, há uma menor redução da produção do ATP quando comparado com os Wistar expostos a hipóxia (Figura 41 A e B). Quando realizamos o tratamento prévio com os moduladores de SIRTos e expomos as células controle (Wistar) a hipóxia moderada, vemos que o Rsv e o Sir aumentam de forma significativa a capacidade de produção do ATP em comparação com o grupo exposto somente a hipóxia moderada (Figura 41 A). Mas o NAM não exerce esse efeito. Curiosamente, o tratamento com o NAM nos neurônios SHR aumenta significativamente a capacidade de produção de ATP das células em relação ao grupo exposto somente à hipóxia, enquanto o Rsv e o Sir não causam nenhum efeito (Figura 41 A). Entretanto, é importante mencionar, que os níveis de ATP nos neurônios SHR em todos os casos é maior do que nos Wistar.

Já no caso da hipóxia intensa, nos neurônios Wistar previamente tratados, todos os compostos favorecem a produção de ATP nas células de forma significativa em comparação com o grupo exposto somente a hipóxia (Figura 41 B). Enquanto nos SHR, os níveis de ATP permanecem iguais em relação às células expostas somente à hipóxia. Novamente, é importante mencionar que, em todos os casos, os níveis de ATP são maiores nos SHR (Figura 41 B). Isso demonstra uma potencial capacidade dos moduladores de aumentar a capacidade de produção de ATP nas células sob hipóxia, um efeito protetor. Além disso, demonstra que os neurônios SHR resistem mais às quedas de ATP provocadas pela hipóxia, do que os Wistar.

Quando analisamos os níveis de piruvato, vemos que sob hipóxia química, ambos os neurônios aumentam de forma significativa a produção desse composto energético. Curiosamente, os Wistar produzem significativamente mais piruvato que

os SHR (Figura 42 A e B). Quando as células foram previamente tratadas com os moduladores de SIRT6 e expostas a hipóxia moderada (800  $\mu$ M), vemos que em todos os casos se tem um aumento significativo da produção de piruvato em relação ao grupo sem tratamento e exposto somente à hipóxia. E ainda, vemos que nos Wistar, essa produção é significativamente maior do que nos SHR (Figura 42 A). Já no caso da exposição da hipóxia intensa (2 mM), vemos, também, que todos os moduladores aumentam de forma significativa a produção do piruvato em relação ao grupo sem tratamento e exposto à hipóxia. Nesse caso, o Rsv aumenta significativamente mais a produção de piruvato nos SHR em relação aos Wistar na mesma condição (Figura 42 B).

Esses dados sugerem que a indução de uma via metabólica compensatória contra a hipóxia, a glicólise, aumenta a capacidade das células em formar piruvato, e consequentemente, os níveis de ATP. Para que isso acontecesse, o piruvato deveria ser convertido em lactato, regenerando  $\text{NAD}^+$ , que serviria de substrato para a glicólise, fomentando a produção de ATP. Como esperado, observamos um aumento significativo da produção de lactato nos neurônios Wistar e SHR após a indução da hipóxia química moderada e intensa em comparação ao grupo sem tratamento (Figura 43 A e B). Todos nossos moduladores também aumentaram a capacidade dos neurônios em produzir lactato em comparação com ambas as situações de hipóxia. Vale dizer que na hipóxia moderada, os neurônios Wistar produzem significativamente mais lactato que os SHR. Na hipóxia intensa, o NAM e o Sir exercem o mesmo efeito, entretanto, o Rsv nos SHR faz com esses neurônios produzam mais lactato (Figura 43 A e B).

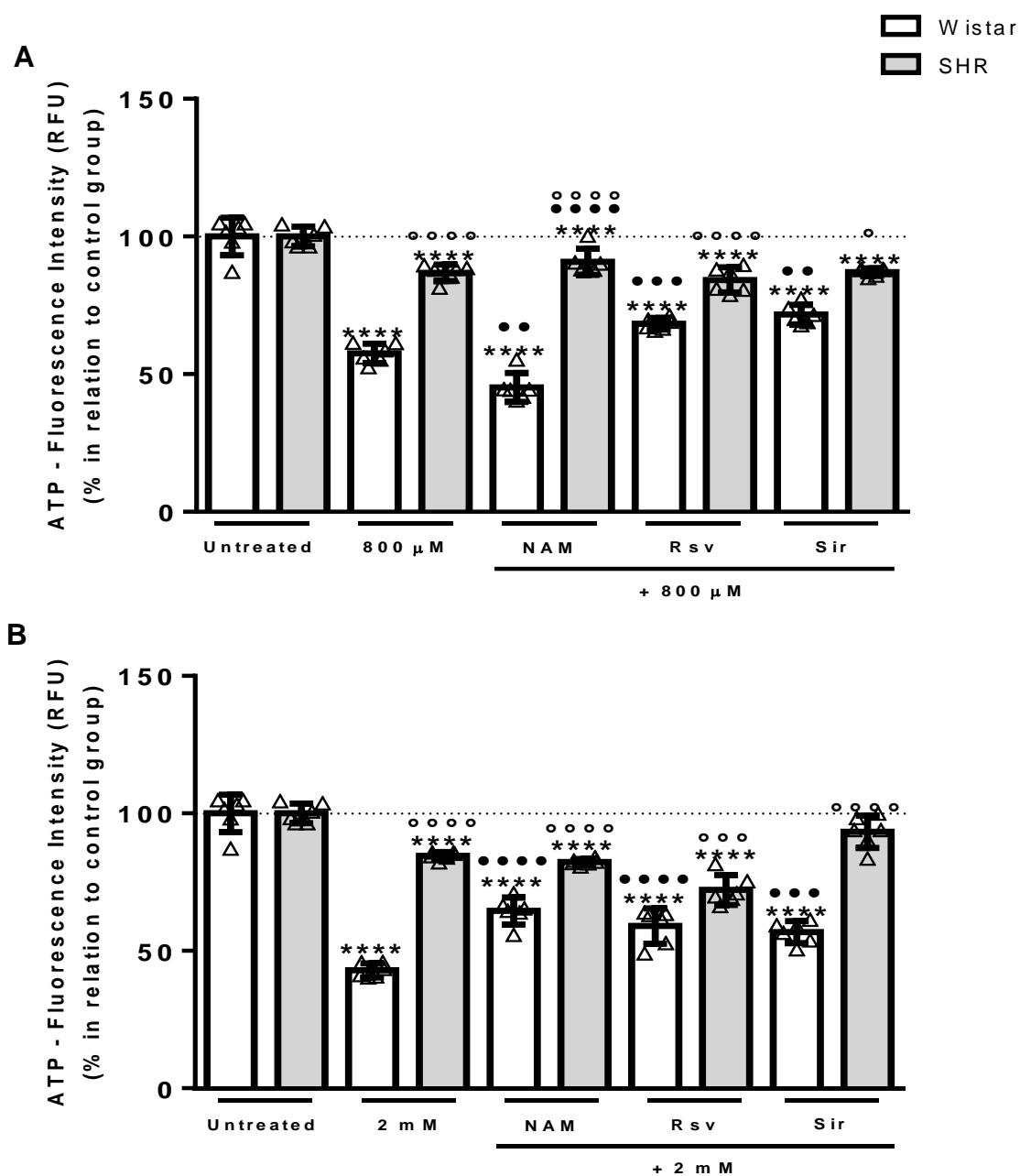
Esses dados podem reforçar a hipótese de que a hipóxia impulsiona a LDH e inibe a PK (Fuhrmann e Brune, 2017), assim vemos o aumento do nível de piruvato e, ainda, mais conversão do piruvato para lactato. Nesse caso, também observamos mais  $\text{NAD}^+$  sendo formado. Assim, vemos que há, de fato, uma quantidade significativamente maior de  $\text{NAD}^+$  nos neurônios Wistar, mas não nos SHR, quando expostos a hipóxia química moderada (Figura 44 A). Ainda, não vemos alterações nos neurônios controle (Wistar) quando foi realizado o tratamento prévio com os moduladores NAM e Rsv, mas há um aumento de NADH significativamente maior do que o grupo sem tratamento e exposto somente a hipóxia quando foi realizado o tratamento prévio com Sir (Figura 44 A). No caso dos SHR previamente tratados e expostos a hipóxia moderada, todos os moduladores aumentam significativamente

os níveis de NADH, em relação aos grupos sem tratamento e expostos somente a hipóxia moderada (Figura 44 A).

Quando analisamos o caso da hipóxia intensa, vemos que não houve alterações nos neurônios Wistar, mas há um aumento significativo de NADH nos neurônios SHR (Figura 44 B). Já o tratamento prévio com o modulador Sir aumenta os níveis de NADH nos neurônios Wistar em comparação com o grupo sem tratamento, mas no tratamento com NAM e Rsv, não houve alterações. No caso dos SHR, todos os moduladores aumentam os níveis de NADH em relação ao grupo sem tratamento, porém, os níveis ficam similares aos das células expostas somente a hipóxia intensa (2 mM) (Figura 44 B). Os dados não nos mostraram o aumento de NAD<sup>+</sup> que esperávamos em todos os casos, entretanto, devemos lembrar que esses substratos são altamente requisitados em diversas vias metabólicas e, a redução de NAD<sup>+</sup> para NADH é rápida.

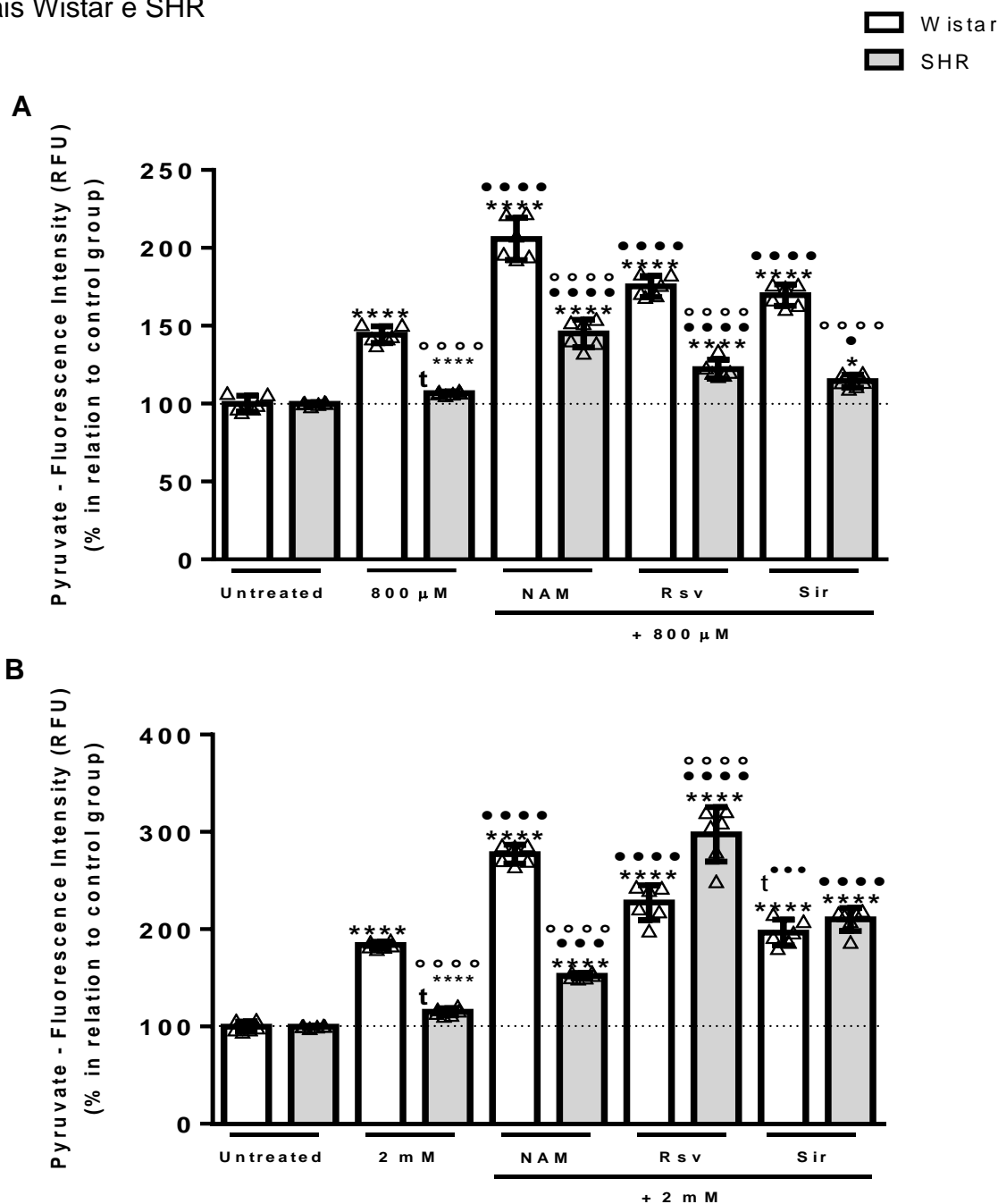


**Figura 41:** Análise dos níveis de ATP em neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



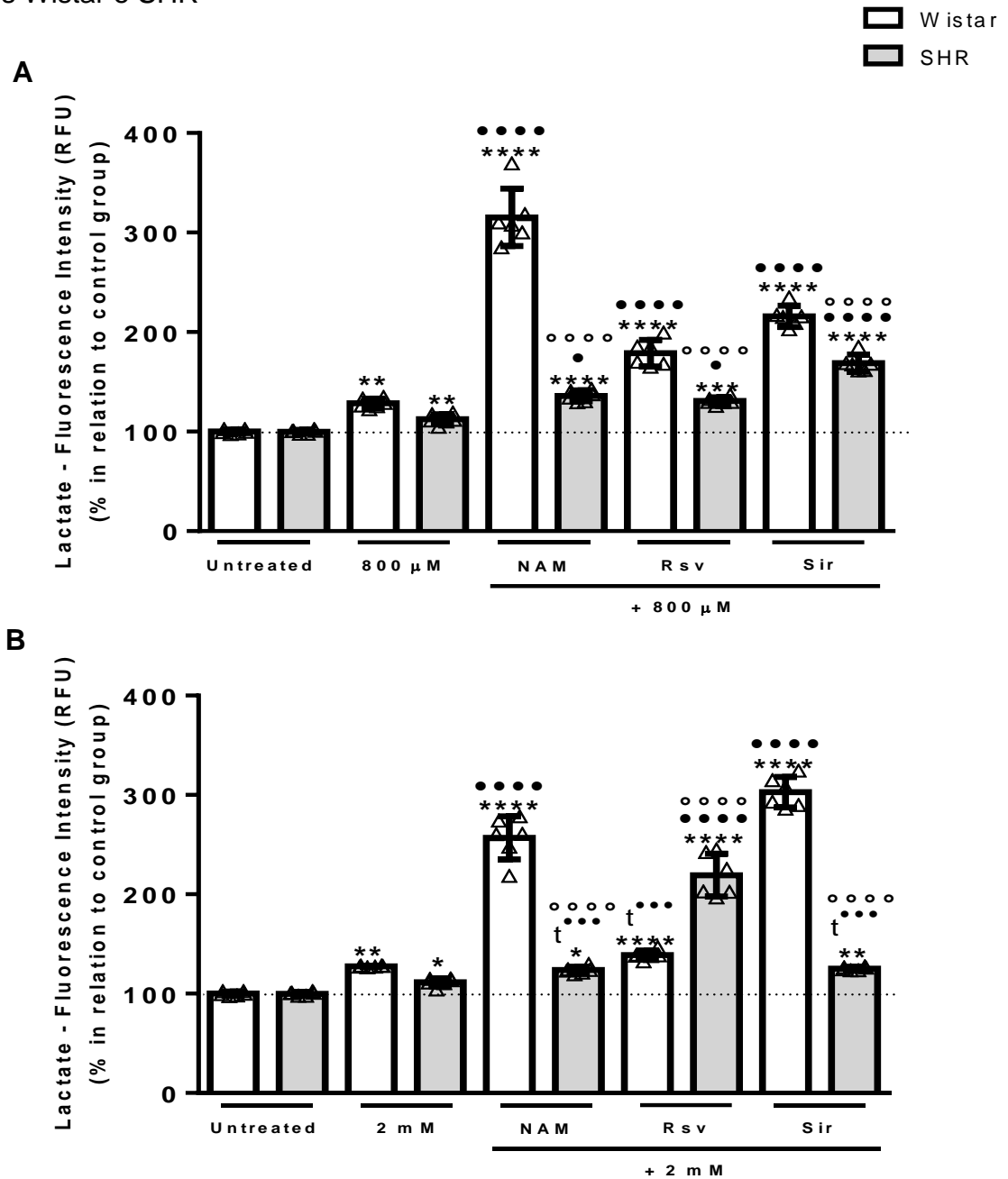
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.00001$ , em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  e \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$ , em relação aos grupos expostos a hipoxia (800  $\mu$ M ou 2 mM); ° $p < 0.01$ , °° $p < 0.001$ , °°° $p < 0.0001$  e °°°° $p < 0.00001$ , em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

**Figura 42:** Análise dos níveis de piruvato em neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



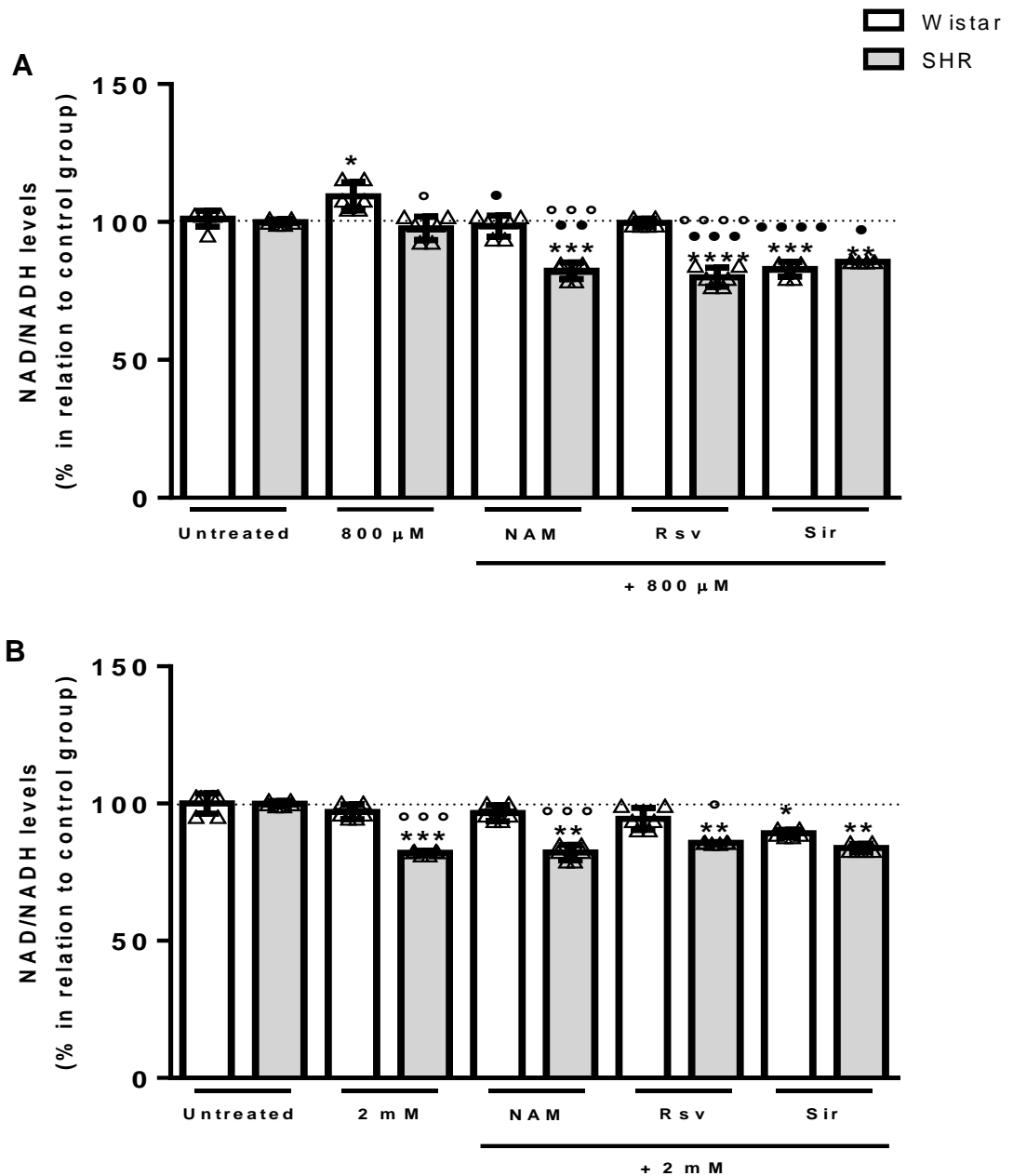
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50 μM), Rsv (0.5 μM) e Sir (5 μM) por 48 horas, e CoCl<sub>2</sub> (800 μM e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT1s, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT1s (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média ± desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo, p<0.05. \*p<0.01, t\*\*\*\*p<0.00001 e \*\*\*\*p<0.00001, em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); t\*\*\*p<0.0001, \*p<0.01, \*\*\*p<0.0001 e \*\*\*\*p<0.00001, em relação aos grupos expostos a hipoxia (800 μM ou 2 mM); \*\*\*\*p<0.00001, em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

**Figura 43:** Análise dos níveis de lactato em neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ . \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$ , em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); t\*\*\* $p < 0.0001$ , • $p < 0.01$  e ••• $p < 0.00001$ , em relação aos grupos expostos a hipoxia (800  $\mu$ M ou 2 mM); °°°° $p < 0.00001$ , em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

**Figura 44:** Análise da razão NAD<sup>+</sup>/NADH em neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50 μM), Rsv (0.5 μM) e Sir (5 μM) por 48 horas, e CoCl<sub>2</sub> (800 μM e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT1s, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT1s (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média ± desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo, p<0.05. \*p<0.01, \*\*p<0.0001, \*\*\*p<0.0001 e \*\*\*\*p<0.00001, em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); °p<0.01, °°p<0.001, °°°p<0.0001 e °°°°p<0.00001, em relação aos grupos expostos a hipoxia (800 μM ou 2 mM); °p<0.01, °°p<0.0001 e °°°p<0.00001, em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

### **3.2.7.7 Investigação do metabolismo mitocondrial – PCR em tempo real**

Da mesma forma que os experimentos os astrócitos, após verificarmos as disfunções mitocondriais e nos compostos de alta energia, analisamos os genes envolvidos no processo de biogênese (*Pgc1 $\alpha$* , *Nrf1*, *Tfam* e *Tom20*), fissão e fusão mitocondrial (*Drp1*, *Fis 1* e *Mfn2*), bem como do gene responsável pelas defesas antioxidantes (*Nfe2l2*). Assim poderíamos entender se o tratamento com os moduladores afetaria a expressão desses genes e, de alguma forma, protegeria os neurônios Wistar e SHR dos efeitos nocivos da hipóxia.

Os resultados demonstraram que tanto a hipóxia química moderada quanto a intensa aumentam significativamente a expressão do *Pgc1 $\alpha$*  em comparação ao grupo sem tratamento. O efeito é ainda maior nos neurônios Wistar quando comparado com o grupo SHR na mesma condição (Figura 45 A e B). Quando as células controle (Wistar) foram previamente tratadas com os moduladores e expostas a hipóxia química moderada, vemos que a expressão do *Pgc1 $\alpha$*  continua significativamente elevada em comparação com o grupo sem tratamento, porém há uma redução em relação ao grupo exposto somente a hipóxia quando as células foram tratadas com os moduladores Rsv e Sir (Figura 45 A).

Surpreendentemente, no caso dos neurônios SHR, há uma redução significativa da expressão do *Pgc1 $\alpha$*  em relação ao grupo sem tratamento e ao grupo exposto à hipóxia química moderada após o tratamento com NAM e uma redução significativa da expressão do fator após o tratamento com Rsv e Sir, só que em relação ao grupo exposto somente a hipóxia (Figura 45 A). Vale dizer que o tratamento com Rsv fez com que a expressão do *Pgc1 $\alpha$*  voltasse a níveis basais.

No caso da hipóxia intensa, os tratamentos com os moduladores de SIRTs nos neurônios controle (Wistar) reduz de forma significativa a expressão do *Pgc1 $\alpha$*  em relação ao grupo exposto somente a hipóxia, porém a expressão continua elevada em comparação ao grupo sem tratamento (Figura 45 B). Os neurônios SHR na mesma condição de hipóxia, com o tratamento prévio com os moduladores também apresentam uma redução significativa da expressão do *Pgc1 $\alpha$*  em relação ao grupo exposto somente a hipóxia, porém, no caso do NAM e Rsv, a expressão permanece elevada em relação ao grupo sem tratamento (Figura 45 B). Os dados sugerem que a hipóxia química estimula, enquanto os moduladores suprimem o gene regulador da via da biogênese mitocondrial.

Quando analisamos a expressão do gene *Nrf1*, que é estimulado pelo *Pgc1 $\alpha$* , e participa do processo de biogênese na criação de componentes nucleares da cadeia respiratório mitocondrial, vemos que nas condições de hipóxia química ou intensa, tanto nos neurônios Wistar, quanto nos SHR, há um aumento significativo de sua expressão (Figura 46 A e B). O que, de fato, poderia ser um estímulo impulsionado pelo *Pgc1 $\alpha$* . E, ainda, quando as células Wistar foram previamente tratadas com os moduladores e expostas a hipóxia moderada, vemos que há um aumento significativo da expressão o fator em relação ao grupo exposto somente a hipóxia e sem tratamento, em todos os casos, o que também condiz com o resultado observado na análise do *Pgc1 $\alpha$*  (Figura 46 A).

No caso dos neurônios SHR, vemos uma redução significativa da expressão do *Nrf1* com o tratamento com NAM, em relação ao grupo exposto somente à hipóxia, ficando bem perto dos níveis basais. Um aumento da expressão em relação ao grupo sem tratamento com Rsv, sendo similar a ao grupo exposto somente a hipóxia e, também, um aumento significativo da expressão do *Nrf1* em relação ao grupo exposto somente a hipóxia moderada e ao grupo sem tratamento, quando as células são tratadas com Sir (Figura 46 A). Esses resultados também condizem com as análises do *Pgc1 $\alpha$*  (Figura 45 A).

Já na exposição a hipóxia intensa, novamente, todos os moduladores de SIRT6, favorecem de forma significativa a expressão de *Nrf1* nos neurônios Wistar e SHR em relação ao grupo sem tratamento e exposto somente a hipóxia (Figura 46 B). Nesse caso, o tratamento com os moduladores nos neurônios Wistar exerce o melhor efeito. Os dados observados até agora indicam que, de fato, parece haver um estímulo da biogênese durante a hipóxia química e após o tratamento prévio com os moduladores.

Como observamos essas alterações, fomos investigar a expressão do fator subsequente da via, o *Tfam* que participa do processo de replicação do mtDNA na biogênese mitocondrial e é estimulado pelo *Nrf1*. Curiosamente, a expressão desse fator é significativamente reduzida quando as células (Wistar e SHR) são submetidas a hipóxia química moderada ou intensa em relação ao grupo sem tratamento (Figura 47 A e B). Ainda, quando os neurônios são submetidos ao tratamento prévio com os moduladores, em todos os casos a expressão do *Tfam* é significativamente reduzida em relação ao grupo sem tratamento e exposto à hipóxia moderada e intensa, sendo o efeito mais expressivo na situação severa de hipóxia e

nos neurônios SHR (Figura 47 A e B). Esse resultado demonstra que apesar do estímulo da via da biogênese mitocondrial pelo *Pgc* e *Nrf1* o mecanismo de replicação do mtDNA, essencial para a criação de novas organelas, não é estimulado.

Todavia, para verificar se de fato, estava-se criando novas mitocôndrias nos neurônios Wistar e SHR, verificamos a expressão do *Tom20*, que é usado frequentemente como um marcador de quantidade de mitocôndrias. Nesse caso, observamos um resultado muito similar ao caso do *Tfam*; em ambas as situações de hipóxia, nos dois grupos (Wistar e SHR), houve uma redução significativa da expressão do *Tom20* em relação aos respectivos grupos sem tratamento (Figura 48 A e B). E, ainda, o tratamento com todos os moduladores diminuem significativamente a expressão desse gene (Figura 48 A e B). Os resultados são contraditórios e indicam que, nos neurônios primários do córtex dos animais Wistar e SHR, a via da biogênese mitocondrial não estava sendo concluída. Estranhamente, nos neurônios submetidos a hipóxia neonatal (SHR) quando comparados com os Wistar apresentavam um estímulo da biogênese mitocondrial (Figura 34), por isso esperávamos que a hipóxia química causasse o mesmo efeito, mas não foi o ocorrido.

Uma maneira de explicar essas alterações seria através da análise da dinâmica mitocondrial, especificamente da fissão e fusão das mitocôndrias. Então, ao analisarmos o gene *Fis1* vemos que há um aumento significativo de sua expressão em relação ao grupo sem tratamento, após a indução da hipóxia química moderada ou intensa nos neurônios controle (Figura 49 A e B). Nos SHR a hipóxia moderada ou intensa causa diminuição de forma significativa a expressão desse fator (Figura 49 A e B). No mesmo sentido, quando as células (Wistar e SHR) foram previamente tratadas com os moduladores, vemos que em todos os casos há uma significativa redução da expressão do *Fis1* em comparação ao grupo exposto somente a hipóxia e, em alguns casos, ao grupo sem tratamento (Figura 49 A e B).

Para termos certeza de que a via da fissão está aumentada nos Wistar e desregulada nos SHR após a hipóxia química e de que os moduladores, de fato, reduzem essa via, analisamos a expressão do *Drp1*. Novamente vemos que há uma redução da expressão do *Drp1* de forma significativa tanto nos Wistar e nos SHR em relação ao grupo sem tratamento quando expostos a hipóxia moderada ou intensa, sendo é bem expressivo nos neurônios SHR e ainda mais na hipóxia intensa (Figura

49 C e D). Nessa análise, também, vemos que todos os moduladores reduzem de forma significativa a expressão desse fator. No caso da hipóxia moderada e intensa nos neurônios Wistar e SHR, observamos uma diminuição significativa em relação ao grupo sem tratamento e exposto somente a hipóxia (Figura 49 C). Na hipóxia intensa vemos o mesmo padrão nos Wistar e uma redução significativa nos neurônios SHR tratados previamente com o NAM e Sir (Figura 49 D).

Vimos anteriormente que os neurônios SHR expressam mais esses fatores em comparação com neurônios Wistar sem tratamento, indicando uma regulação entre criação de novas mitocôndrias e fissão das mesmas, um possível mecanismo de compensação contra a hipóxia neonatal. Assim, podemos concluir que, de fato, as situações de hipóxia favorecem a fissão mitocondrial nos neurônios controle, talvez numa tentativa de favorecer a via da mitofagia reciclando as organelas defeituosas evitando a indução de apoptose. E desregula essa capacidade nos SHR, o que pode desfavorecer-los a longo prazo.

Quando analisamos a fusão mitocondrial, um mecanismo associado ao aumento da capacidade metabólica das células e, conseqüentemente, da viabilidade celular, através da expressão do *Mfn2*, vemos que há uma diminuição significativa quando os neurônios Wistar e SHR são expostos a hipóxia química moderada ou intensa (Figura 50 A e B). Porém, surpreendentemente o tratamento prévio com os moduladores aumenta expressivamente e significativamente a expressão de *Mfn2* tanto nos neurônios Wistar, quanto nos SHR expostos a hipóxia química moderada ou intensa (Figura 50 A e B). Esse dado sugere um potencial mecanismo compensatório impulsionado pela modificação epigenética dos moduladores de SIRTs proporcionando a fusão mitocondrial numa tentativa de se ajustar às demandas energéticas nos períodos de crise metabólica, como no caso da hipóxia química.

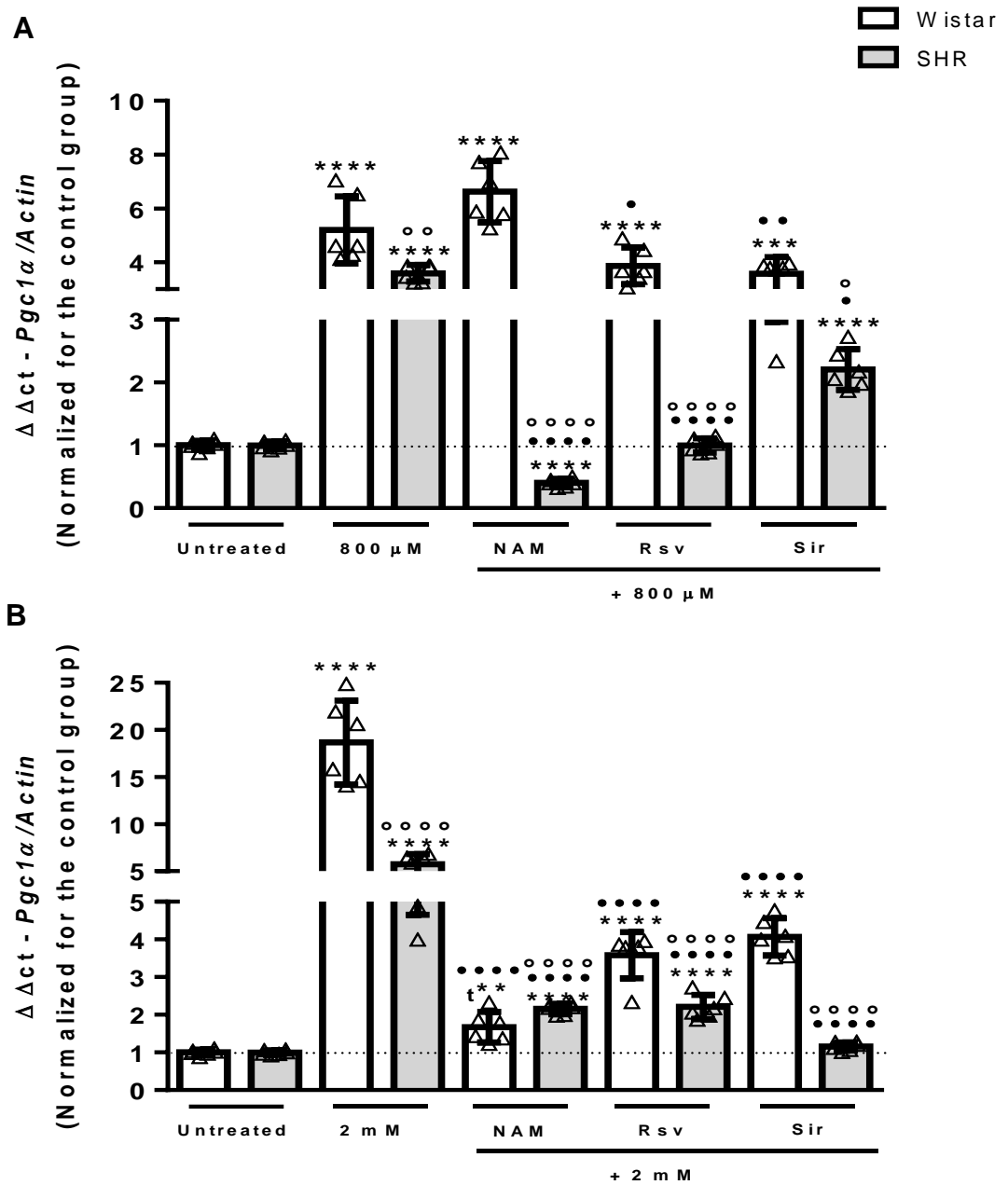
Até então sabemos que a hipóxia química causa uma disfunção mitocondrial tanto nos neurônios Wistar, quanto nos SHR, e parece desregular a capacidade energética de ambos. Essas alterações modificam a expressão de uma série de genes, como vimos, ligados a biogênese, metabolismo e dinâmica mitocondrial. A modificação epigenética causada pelos moduladores parece amenizar os efeitos da hipóxia, aperfeiçoando mecanismos de compensação, impulsionando a glicólise, criando componentes dos complexos mitocondriais e aumentando a capacidade de fusão mitocondrial, além de exercerem um efeito antioxidante que, certamente, atua



sobre melhorando a viabilidade das células. Para entender se os efeitos antioxidantes observados estavam ligados com algum estímulo epigenético, analisamos a expressão do *Nfe2l2*.

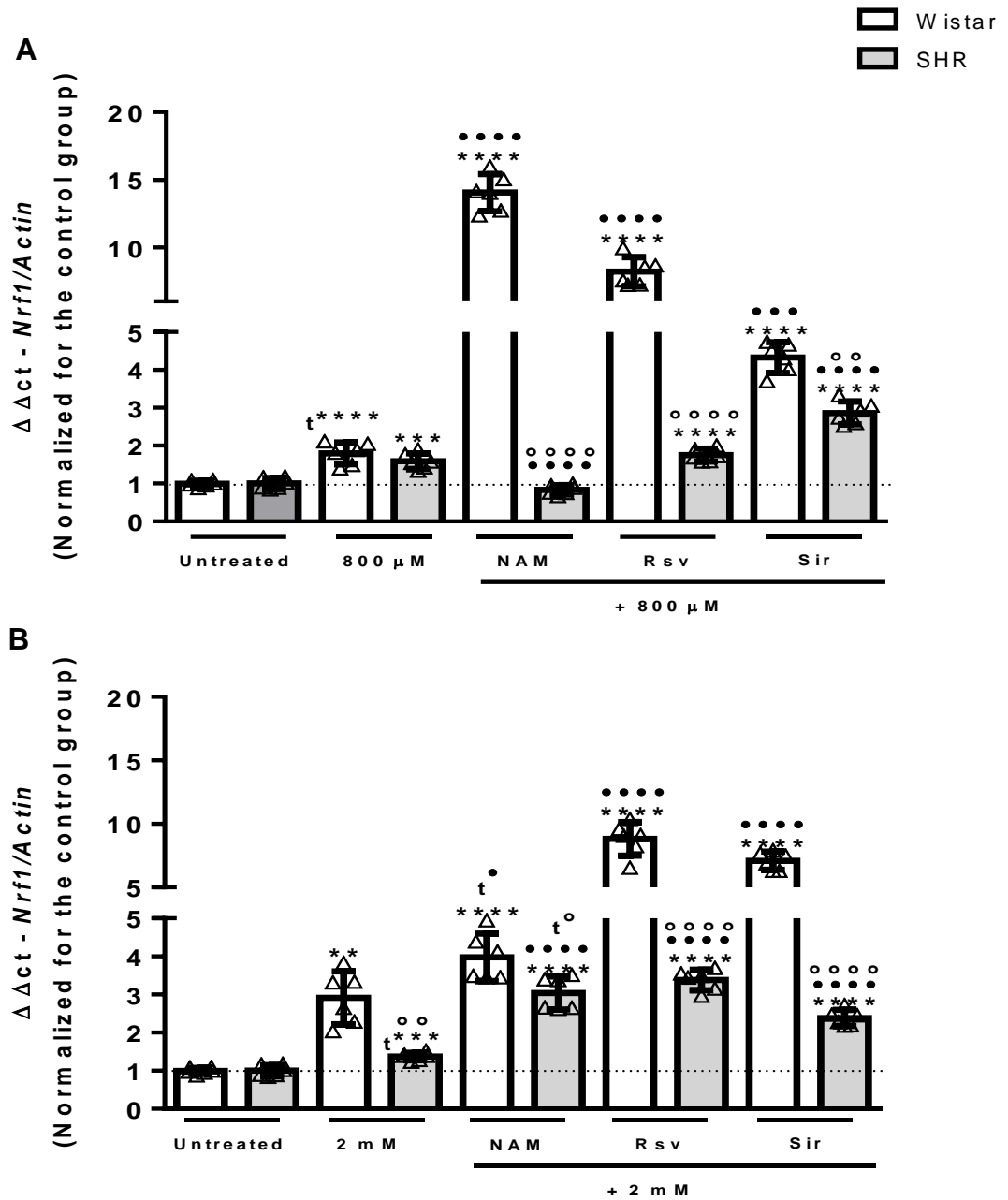
Nesse caso, vemos que na situação de hipóxia moderada ou intensa nos neurônios controle (Wistar) há um aumento significativo da expressão desse fator, enquanto nos neurônios SHR, há uma redução em comparação com os respectivos grupos sem tratamento (Figura 51 A e B). Esse dado revela que, de fato, há uma desregulação da capacidade compensatória dos neurônios SHR, o que se relaciona aos dados observados nas análises de ROS e superóxido, pois apresentavam maiores níveis dos dois em relação ao grupo Wistar na mesma condição (Figura 38 e 39). Contudo, quando os neurônios de ambos os grupos foram previamente tratados com os moduladores de SIRT, vemos um significativo aumento da expressão do *Nfe2l2* em relação ao grupo sem tratamento e exposto somente a hipóxia (Figura 51 A e B). Importante mencionar, que os efeitos foram expressivamente maiores nos neurônios controle. Aqui, mais uma vez, os dados demonstram que o tratamento prévio com os moduladores pode proteger as células do estresse oxidativo causado pela hipóxia.

**Figura 45:** Alterações na expressão do gene *Pgc1 $\alpha$*  nos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



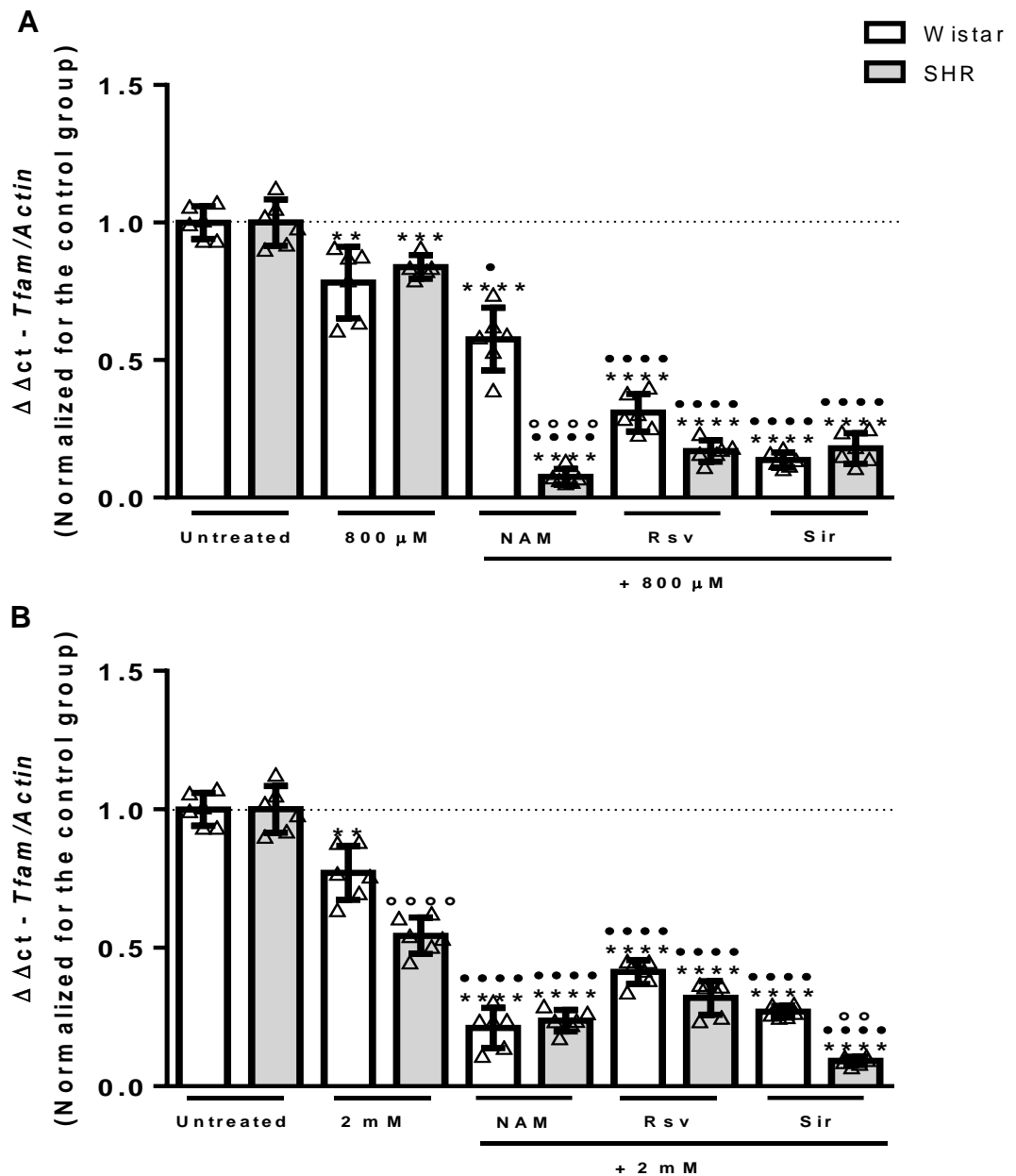
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu$ M), Rsv (0.5  $\mu$ M) e Sir (5  $\mu$ M) por 48 horas, e  $CoCl_2$  (800  $\mu$ M e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT6, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT6 (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey e teste t de *student* quando necessário. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .  $t^{**}p < 0.001$ ,  $^{**}p < 0.001$ ,  $^{***}p < 0.0001$  e  $^{****}p < 0.0001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR);  $^{\bullet}p < 0.01$ ,  $^{\bullet\bullet}p < 0.001$ ,  $^{\bullet\bullet\bullet}p < 0.0001$  e  $^{\bullet\bullet\bullet\bullet}p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu$ M ou 2 mM).  $^{\circ}p < 0.01$ ,  $^{\circ\circ}p < 0.001$  e  $^{\circ\circ\circ}p < 0.00001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

**Figura 46:** Alterações na expressão do gene *Nrf1* nos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



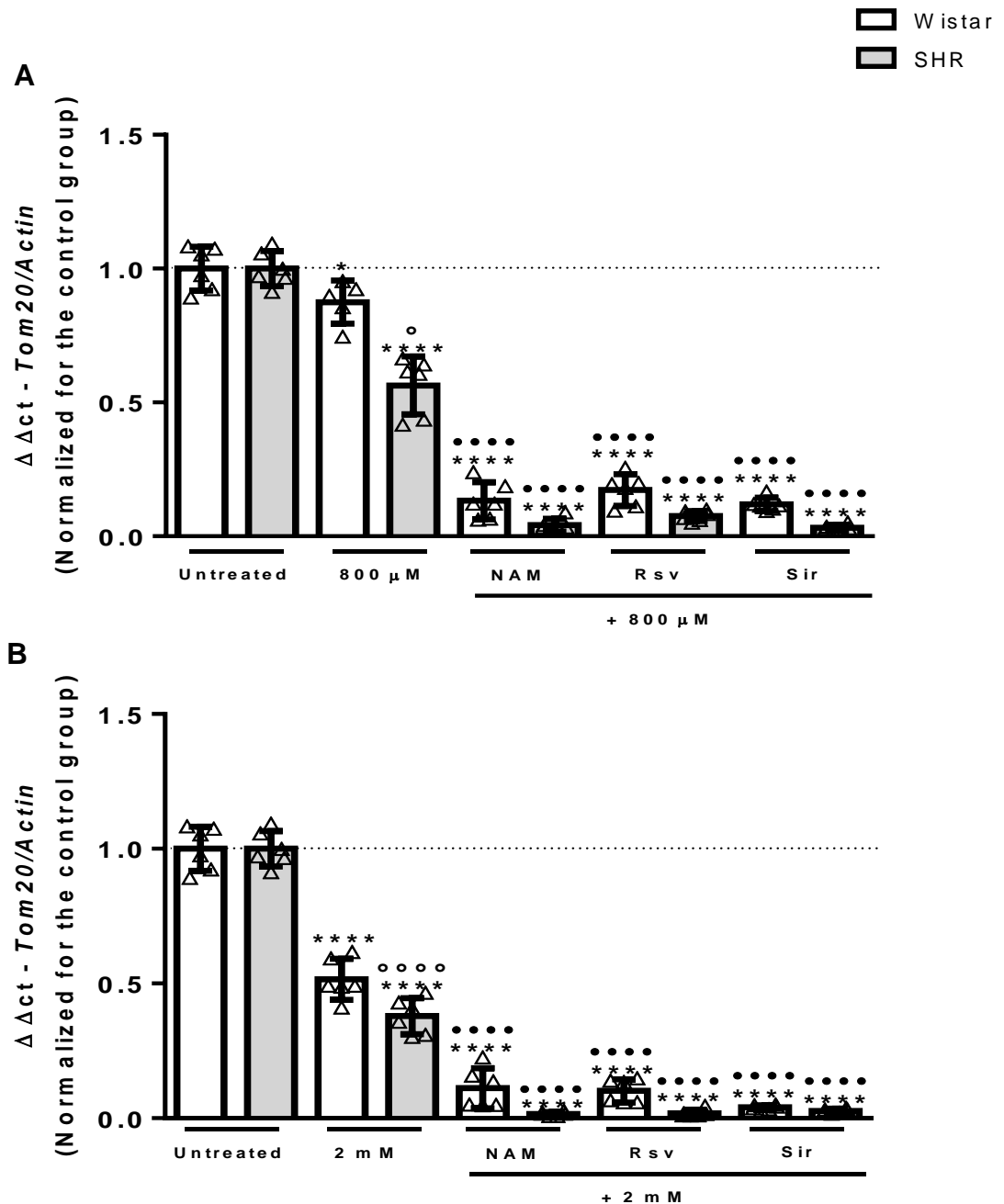
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu\text{M}$ ), Rsv (0.5  $\mu\text{M}$ ) e Sir (5  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu\text{M}$  e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey e teste t de *student* quando necessário. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .  $t^{**}p < 0.001$ ,  $^{***}p < 0.0001$  e  $^{****}p < 0.00001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR);  $\bullet p < 0.01$ ,  $\bullet\bullet p < 0.001$ ,  $\bullet\bullet\bullet p < 0.0001$  e  $\bullet\bullet\bullet\bullet p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu\text{M}$  ou 2 mM).  $^{\circ}p < 0.01$ ,  $^{\circ\circ}p < 0.001$  e  $^{\circ\circ\circ}p < 0.00001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

**Figura 47:** Alterações na expressão do gene *Tfam* nos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



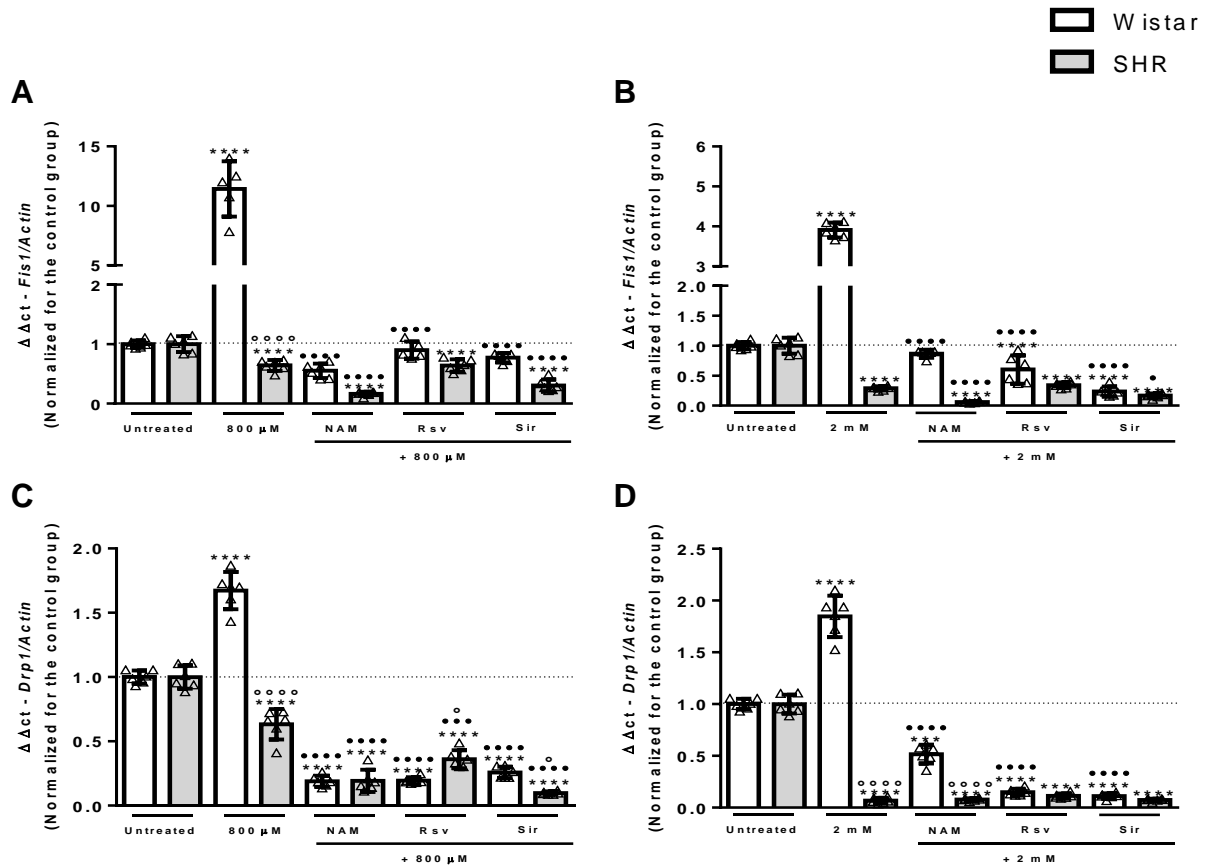
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu M$ ), Rsv (0.5  $\mu M$ ) e Sir (5  $\mu M$ ) por 48 horas, e  $CoCl_2$  (800  $\mu M$  e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT6, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT6 (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey e teste t de *student* quando necessário. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .  $t^{**}p < 0.001$ ,  $^{**}p < 0.001$ ,  $^{***}p < 0.0001$  e  $^{****}p < 0.00001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR);  $\bullet p < 0.01$ ,  $\bullet\bullet p < 0.001$ ,  $\bullet\bullet\bullet p < 0.0001$  e  $\bullet\bullet\bullet\bullet p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu M$  ou 2 mM).  $\circ p < 0.01$ ,  $\circ\circ p < 0.001$  e  $\circ\circ\circ p < 0.00001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

**Figura 48:** Alterações na expressão do gene *Tom20* nos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



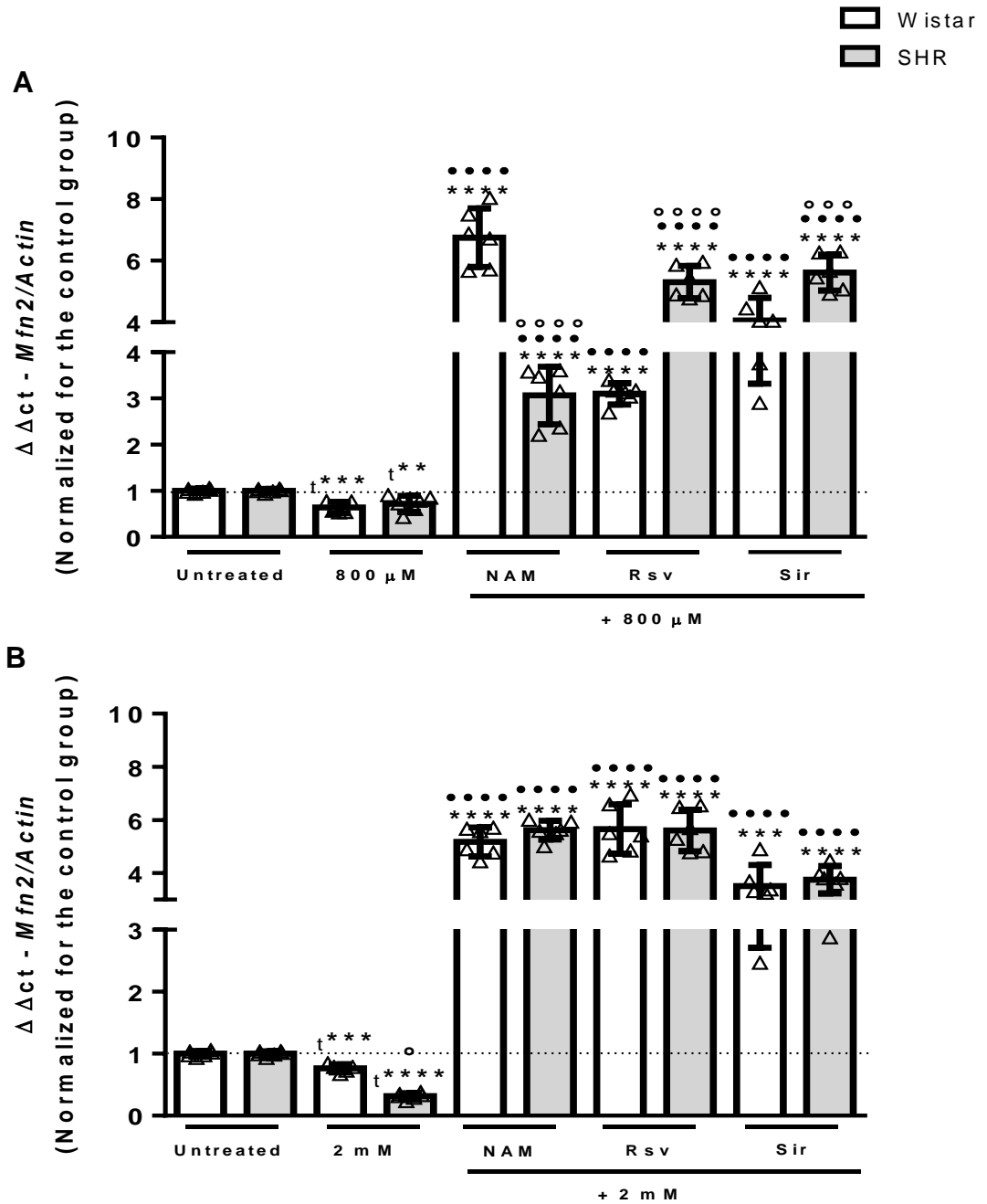
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu M$ ), Rsv (0.5  $\mu M$ ) e Sir (5  $\mu M$ ) por 48 horas, e  $CoCl_2$  (800  $\mu M$  e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey e teste t de *student* quando necessário. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .  $t^{**}p < 0.001$ ,  $t^{***}p < 0.0001$  e  $t^{****}p < 0.00001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR);  $\bullet p < 0.01$ ,  $\bullet\bullet p < 0.001$ ,  $\bullet\bullet\bullet p < 0.0001$  e  $\bullet\bullet\bullet\bullet p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu M$  ou 2 mM);  $\circ p < 0.01$ ,  $\circ\circ p < 0.001$  e  $\circ\circ\circ p < 0.00001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

**Figura 49:** Alterações na expressão dos genes *Fis1* e *Drp1* nos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



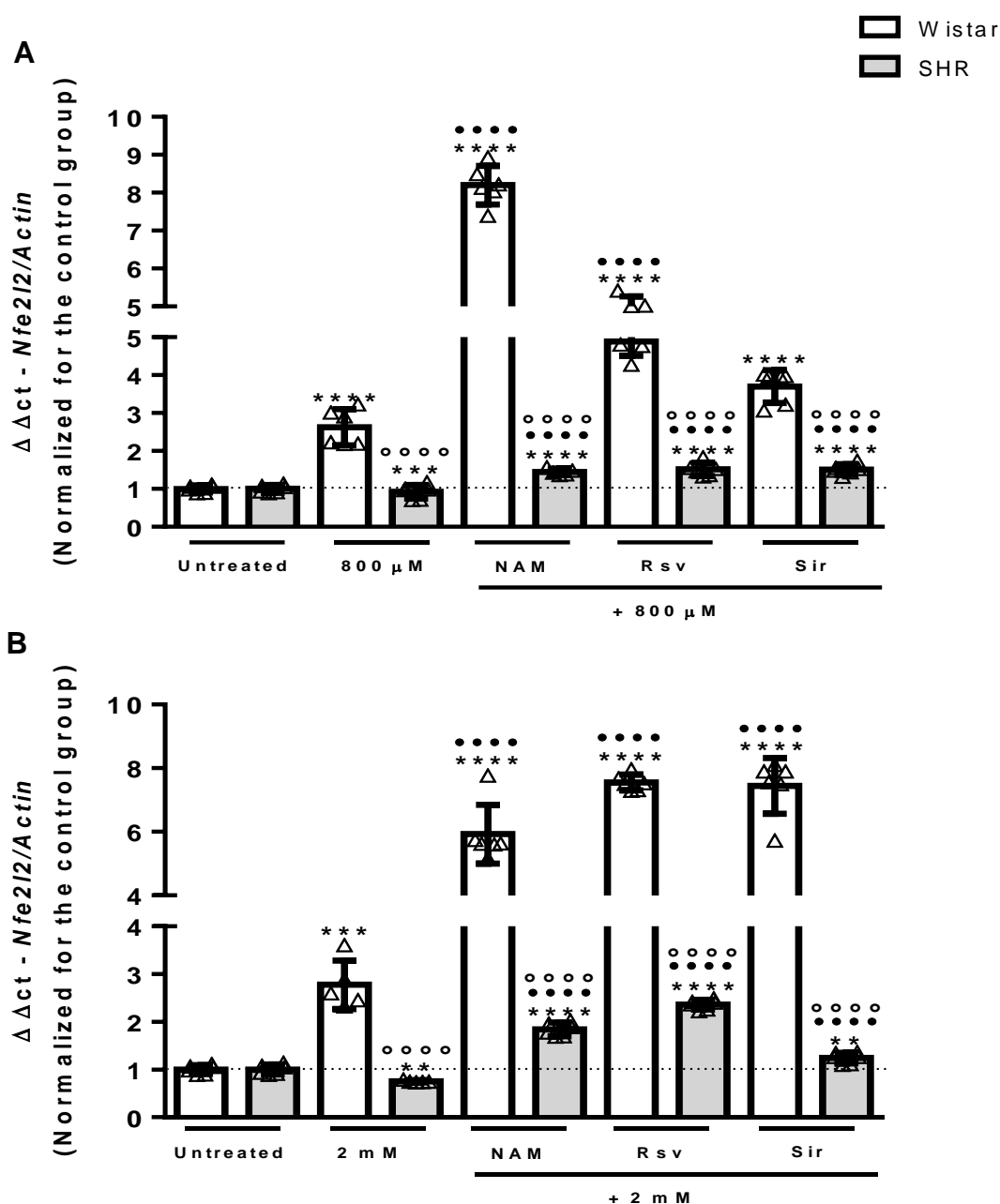
**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu\text{M}$ ), Rsv (0.5  $\mu\text{M}$ ) e Sir (5  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas, e  $\text{CoCl}_2$  (800  $\mu\text{M}$  e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \* $p < 0.01$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu\text{M}$  ou 2 mM). ° $p < 0.01$  e °°°° $p < 0.00001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

**Figura 50:** Alterações na expressão do gene *Mfn2* nos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50  $\mu M$ ), Rsv (0.5  $\mu M$ ) e Sir (5  $\mu M$ ) por 48 horas, e  $CoCl_2$  (800  $\mu M$  e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRTs, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRTs (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ . e  $****p < 0.0001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR);  $***p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu M$  ou 2 mM).  $^{\circ}p < 0.01$  e  $^{\circ\circ\circ}p < 0.00001$  em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.

**Figura 51:** Alterações na expressão do gene *Nfe2l2* nos neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR



**Legenda:** As células foram tratadas com NAM (50 μM), Rsv (0.5 μM) e Sir (5 μM) por 48 horas, e CoCl<sub>2</sub> (800 μM e 2 mM), por 24 horas. (A) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia moderada e modulação de SIRT6, e (B) gráfico de barras representativo das análises após hipóxia intensa e modulação de SIRT6 (N = 3, em duplicatas). Dados representados em média ± desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo sem tratamento (*Untreated*). Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo p<0.05. \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001 e \*\*\*\*p<0.0001 em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar ou SHR); \*\*\*\*p<0.0001 em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800 μM ou 2 mM). °p<0.01 e °°°p<0.0001 em relação ao grupo Wistar de mesmo tratamento.



### **3.2.8 Análise da função neural**

Para entender como as alterações no metabolismo e dinâmica mitocondrial poderiam influenciar na funcionalidade dos neurônios primários do córtex dos animais Wistar e SHR, avaliamos os níveis proteicos de sinaptofisina e sinaptotagmina, responsáveis pela formação e liberação das vesículas sinápticas, respectivamente, e PSD95, uma proteína de ancoragem de vesículas sinápticas. E, ainda, analisamos os níveis de semaforina e plexina, integrantes essenciais da via de poda neural. A técnica detalhada, bem como a descrição dos anticorpos e suas concentrações podem ser observadas na seção 2.8.

Em primeiro lugar, investigamos os níveis dessas proteínas entre os neurônios Wistar e SHR sem nenhum tratamento, para entender se já havia alguma alteração em resposta à hipóxia neonatal. Nesse caso, observa-se que os neurônios submetidos à hipóxia neonatal (SHR) possuem níveis significativamente elevados de plexina B1 e Semaforina A3 em relação ao grupo Wistar sem tratamento (Figura 52 A e B), uma possível indicação de que a via de poda neural está ativada. Ainda, esses animais apresentam significativamente baixos níveis de sinaptofisina, enquanto os níveis de sinaptotagmina estão elevados em relação ao grupo Wistar (controle) (Figura 52 C e D).

Esses dados parecem sugerir que esses neurônios formam menos vesículas, entretanto, as vesículas formadas são mais liberadas na fenda sináptica. De fato, vemos que os níveis de PSD95 (Figura 52 E), uma proteína de ancoragem das vesículas sinápticas, também se encontra significativamente elevado nos neurônios primários do córtex de animais que passaram pela situação de hipóxia intrauterina (SHR).

Ao observar essas alterações nos neurônios SHR, fomos verificar como a hipóxia química intensa (2 mM) ou o tratamento com NAM (50  $\mu$ M) poderia alterar os níveis dessas proteínas nos neurônios Wistar e SHR.

Vemos na Figura 53 A, que os níveis de plexina B1 nos neurônios Wistar não se altera sob hipóxia química intensa, porém há uma redução significativa quando as células foram tratadas somente com o modulador NAM em relação ao grupo sem tratamento e exposto somente a hipóxia. Ainda, quando os neurônios primários dos animais controle (Wistar) foram previamente tratados com NAM e expostos a hipóxia, vemos uma redução significativa em relação ao grupo sem tratamento, exposto somente a hipóxia e tratado com apenas com NAM (Figura 53 A). Já no

caso da semaforina 3A a situação de hipóxia química intensa, o tratamento com o NAM e a exposição prévia ao NAM e depois a hipóxia aumenta significativamente os níveis de semaforina 3A, mas apenas em relação ao grupo sem tratamento (Figura 53 B).

Já no caso da proteína sinaptofisina, a hipóxia química intensa reduz significativamente os níveis protéicos em relação ao grupo sem tratamento. O NAM aumenta de forma significativa os níveis de sinaptofisina em relação ao grupo exposto apenas a hipóxia e, o tratamento prévio com NAM seguido da exposição a hipóxia química intensa, reduz os níveis de sinaptofisina em relação ao grupo sem tratamento, exposto somente a hipóxia e exposto somente ao NAM (Figura 53 C).

Quando analisamos a sinaptotagmina, vemos que a hipóxia química intensa aumenta os níveis dessa proteína significativamente em relação ao grupo controle. O mesmo acontece com o tratamento com NAM, porém também em relação ao grupo exposto somente a hipóxia. Entretanto, o tratamento com NAM seguido da exposição à hipóxia química reduz de forma significativa os níveis de sinaptotagmina em relação a todos os grupos (Figura 53 D).

Já os resultados da proteína PSD95 demonstram que a hipóxia química intensa, reduz de forma significativa os níveis da proteína em relação ao grupo sem tratamento. Porém, quando as células foram expostas somente ao NAM, vemos que há um aumento dos níveis de PSD95 em relação ao grupo sem tratamento e exposto somente a situação de hipóxia química intensa. Ainda, quando as células foram previamente tratadas com NAM e submetidas à hipóxia química intensa, vemos que há um aumento de PSD95 em relação ao grupo sem tratamento, exposto somente a hipóxia e tratado somente com NAM (Figura 53 E).

Como vimos diversas modificações nos neurônios primários do córtex de animais controle (Wistar), fomos verificar o que acontecia nos neurônios SHR nas mesmas condições. Nesse caso, vemos que os níveis da proteína plexina B1 estavam significativamente diminuídos com os neurônios expostos a hipóxia química intensa (2 mM). Porém, observa-se um aumento significativo quando as células foram tratadas apenas com o modulador NAM (50  $\mu$ M). Entretanto, com o tratamento prévio com NAM e exposição posterior a hipóxia química intensa, vemos que há uma redução de forma significativa dos níveis de plexina B1 em comparação com o grupo sem tratamento, exposto somente a hipóxia química intensa e tratado apenas com NAM (Figura 54 A).

Analisando a proteína semaforina 3A vemos novamente que, a hipóxia química intensa reduz significativamente os níveis dessa proteína nos neurônios SHR. Aqui, também, quando as células foram tratadas apenas com o NAM, houve um aumento significativo em relação ao grupo exposto somente à hipóxia química intensa. Já quando os neurônios SHR foram tratados com o modulador NAM e expostos a hipóxia química, vemos que há uma redução significativa em relação ao grupo sem tratamento, porém um aumento significativo em relação ao grupo exposto somente à hipóxia. Entretanto, a comparação entre o grupo tratado apenas com o NAM, demonstra uma diminuição significativa dos níveis de semaforina 3A (Figura 54 B).

No caso da sinaptofisina, vemos que a situação de hipóxia intensa aumenta significativamente os níveis dessa proteína nos neurônios SHR. No caso do tratamento com NAM (50  $\mu$ M) observa-se um aumento significativo em relação ao grupo sem tratamento, e uma redução em relação ao grupo exposto somente à hipóxia. Quando os neurônios foram previamente tratados, houve uma redução significativa em comparação com todos os grupos (Figura 54 C).

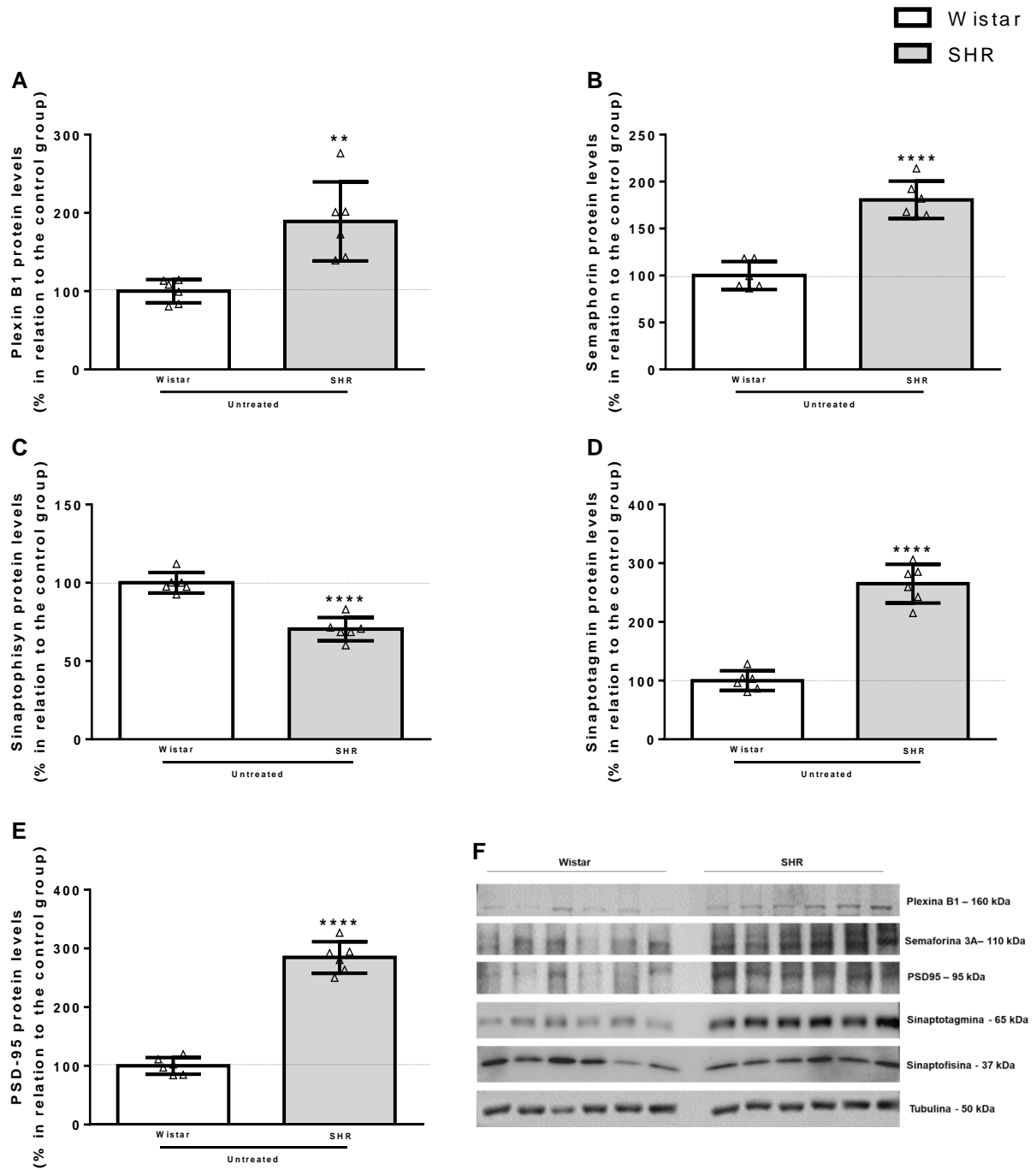
Quando analisamos a sinaptotagmina, vemos que a hipóxia intensa também induz o aumento dos níveis dessa proteína de forma significativa. O tratamento com NAM, nesse caso, aumenta significativamente os níveis de sinaptotagmina em relação ao grupo sem tratamento e exposto somente à hipóxia. Porém, quando houve o tratamento prévio com NAM e exposição a hipóxia química intensa, vemos uma redução significativa em relação ao grupo exposto somente a hipóxia e exposto somente ao NAM. Nesse caso, os níveis da proteína retornam ao basal (Figura 54 D).

Já na análise da proteína PSD95, vemos que a hipóxia intensa reduz significativamente os níveis dessa proteína em relação ao grupo sem tratamento. No caso do grupo tratado com NAM, temos um aumento significativo em relação ao grupo sem tratamento e exposto somente à hipóxia. Porém, quando os neurônios foram tratados com NAM e expostos a hipóxia, vemos uma redução significativa dos níveis de PSD95 em relação ao grupo tratado somente ao NAM e um aumento em relação ao grupo exposto apenas a hipóxia (Figura 54 E).

Como podemos ver, tanto nos Wistar, quanto nos SHR, as disfunções mitocondriais observadas alteram as funções essenciais dos neurônios primários do

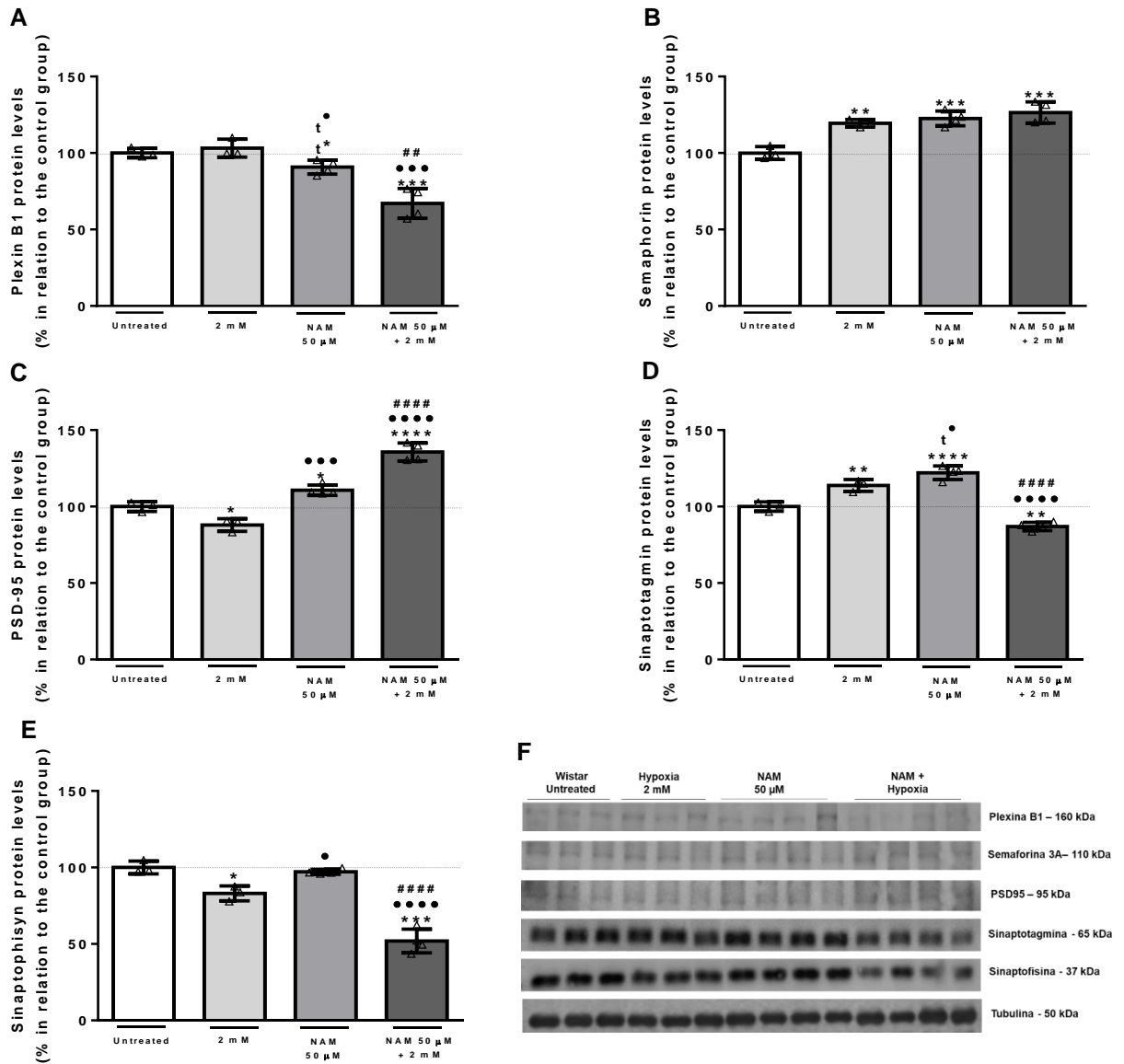
córtex. Entretanto, temos muito a discutir sobre os dados e como eles se comportam em conjunto.

**Figura 52:** Níveis das proteínas relacionadas a função neural entre neurônios primários do córtex de animais Wistar e SHR sem tratamento



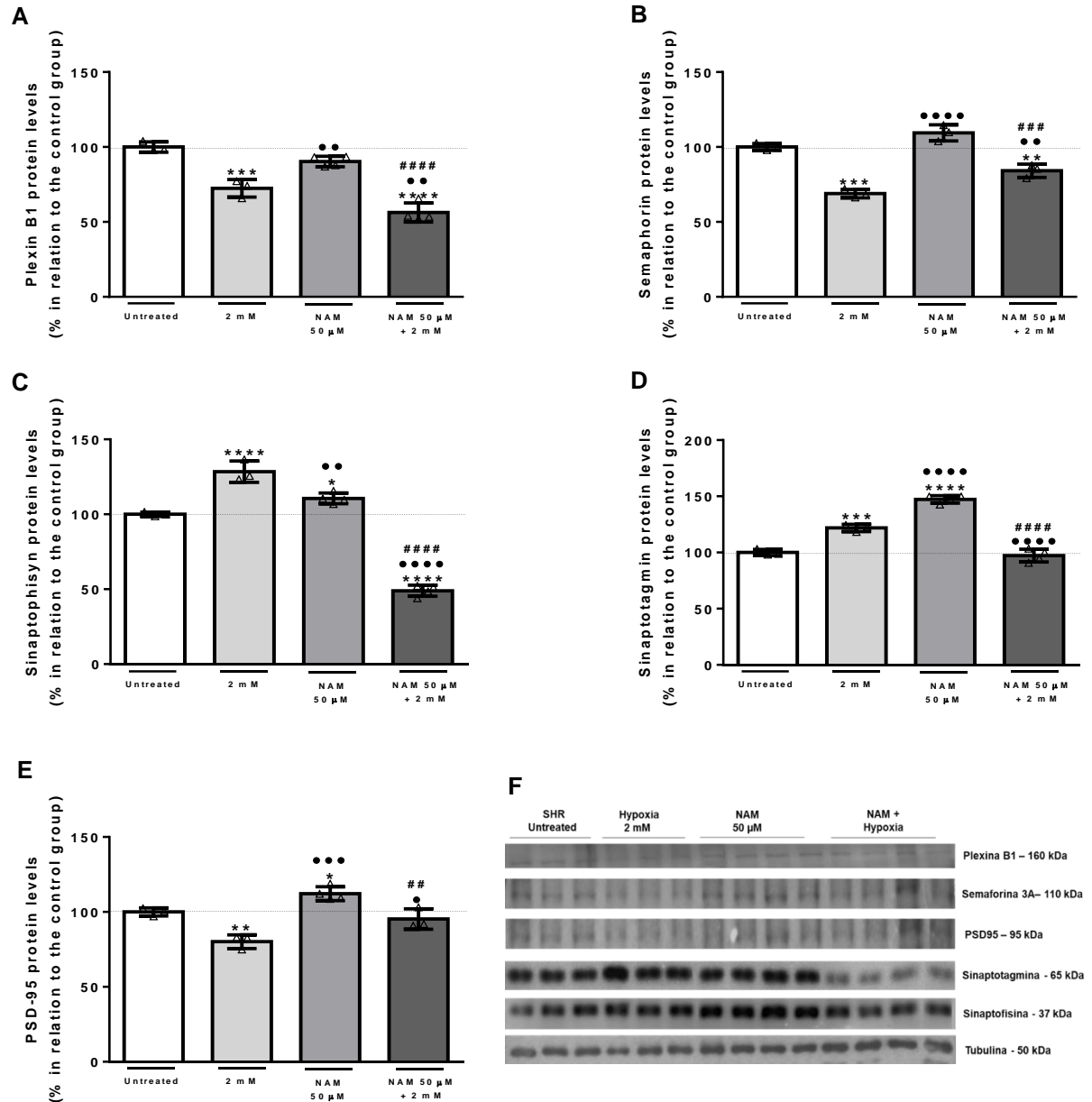
**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo das análises de Plexina B1. (B) gráfico de barras representativo das análises de semaforina 3A. (C) gráfico de barras representativo das análises de Sinaptofisina. (D) gráfico de barras representativo das análises de Sinaptotagmina. (E) gráfico de barras representativo das análises de PSD95. (F) membranas do western-blot (N = 3, em duplicatas). Análise estatística foi realizada por teste t de *student*. Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*). Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.001$  e \*\*\*\* $p < 0.00001$  em relação ao grupo sem tratamento.

**Figura 53:** Níveis das proteínas relacionadas a função neural em neurônios primários do córtex de animais Wistar após o tratamento com NAM e exposição a hipóxia intensa



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo das análises de Plexina B1. (B) gráfico de barras representativo das análises de Semaforina 3A. (C) gráfico de barras representativo das análises de Sinaptofisina. (D) gráfico de barras representativo das análises de Sinaptotagmina. (E) Gráfico de barras representativo das análises de PSD95. (F) membranas processadas do western-blot (N = 3 e 4). Análise estatística foi realizada por One-way anova seguido de teste post-hoc de Tukey e teste t de *student* quando necessário. Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*). Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .  $t^*p < 0.01$ ,  $*p < 0.01$ ,  $**p < 0.001$ ,  $***p < 0.0001$  e  $****p < 0.00001$  em relação ao grupo sem tratamento.  $t^*p < 0.01$ ,  $\bullet p < 0.01$ ,  $\bullet\bullet p < 0.0001$  e  $\bullet\bullet\bullet p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia química intensa (2 mM).  $\#\#\#p < 0.001$  e  $\#\#\#\#p < 0.00001$  em relação ao grupo exposto somente ao NAM (50  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 54:** Níveis das proteínas relacionadas a função neural em neurônios primários do córtex de animais SHR após o tratamento com NAM e exposição a hipóxia intensa



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo das análises de Plexina B1. (B) gráfico de barras representativo das análises de Semaforina 3A. (C) gráfico de barras representativo das análises de Sinaptofisina. (D) gráfico de barras representativo das análises de Sinaptotagmina. (E) gráfico de barras representativo das análises de PSD95. (F) membranas do western-blot (N = 3 e 4). Análise estatística foi realizada por One-way anova seguido de teste post-hoc de Tukey. Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*). Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ .  $t^*p < 0.01$ ,  $*p < 0.01$ ,  $**p < 0.001$ ,  $***p < 0.0001$  e  $****p < 0.00001$  em relação ao grupo sem tratamento.  $*p < 0.01$ ,  $**p < 0.001$ ,  $***p < 0.0001$  e  $****p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia química intensa (2 mM).  $##p < 0.001$ ,  $###p < 0.0001$  e  $####p < 0.00001$  em relação ao grupo exposto somente ao NAM (50  $\mu$ M).

**Tabela 3: resumos dos resultados – seção neurônios**

TABELA DE COMPIALÇÃO DE RESULTADOS	
EXPERIMENTO	SHR em relação ao Wistar (Sem tratamento)
FLUO-3 (Ca <sup>2+</sup> citosólico)	↓
TMRE ( $\Delta\psi_m$ )	↑
DCF (ROS gerais)	↑
Mitosox (superóxido)	↓
MDA (Peroxidação lipídica)	↑
ATP	↓
Piruvato	↑
Lactato	↑
<i>Pgc1<math>\alpha</math></i>	↑
<i>Nrf1</i>	↑
<i>Nfe2l2</i>	↑
<i>Tfam</i>	↑
<i>Tom20</i>	↑
<i>Fis1</i>	↑
<i>Drp1</i>	↑
<i>Mfn2</i>	-

**Legenda:** Foram reunidos os resultados dos testes de função mitocondrial com Fluo-3-AM, TMRE, DCF, mitosox e MDA, bem como dos compostos de alta energia ATP, piruvato, lactato e razão NAD<sup>+</sup>/NADH. E, ainda, foram reunidos os resultados obtidos nos testes de expressão do *Pgc1 $\alpha$* , *Nrf1*, *Nfe2l2*, *Tfam*, *Tom20*, *Fis1*, *Drp1* e *Mfn2*. A seta sem o asterisco representa a comparação entre o grupo controle.



**Tabela 4: resumos dos resultados – seção neurônios Wistar**

Neurônios Wistar - TABELA DE RESULTADOS - Investigação do metabolismo mitocondrial e qPCR									
* em relação a hipóxia									
EXPERIMENTO	CoCl <sub>2</sub> 800 μM	CoCl <sub>2</sub> 800 μM				CoCl <sub>2</sub> 2 mM	CoCl <sub>2</sub> 2 mM		
		NAM (50 μM)	RSV (0.5 μM)	SIRT (5 μM)			NAM (50 μM)	RSV (0.5 μM)	SIRT (5 μM)
FLUO-3 (Ca <sup>2+</sup> citosólico)	↓	↓	↓ e ↓*	↓		↓	↓	↓ e ↓*	↓
TMRE (Δψ <sub>m</sub> )	↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↓	↓	↓	↓
DCF (ROS gerais)	↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
Mitosox (superóxido)	↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓		↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
MDA (peroxidação lipídica)	-	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
ATP	↓	↓ e ↓*	↓ e ↑*	↓ e ↑*		↓	↓ e ↑*	↓ e ↑*	↓ e ↑*
PIRUVATO	↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
LACTATO	↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Pgc1α</i>	↑	↑	↓ e ↑*	↓ e ↑*		↑	↓ e ↑*	↓ e ↑*	↓ e ↑*
<i>Nrf1</i>	↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Nfe2l2</i>	↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Tfam</i>	↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
<i>Tom20</i>	↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
<i>Fis1</i>	↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
<i>Drp1</i>	↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
<i>Mfn2</i>	↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*

**Legenda:** Foram reunidos os resultados dos testes de função mitocondrial com Fluo-3-AM, TMRE, DCF, mitosox e MDA, bem como dos compostos de alta energia ATP, piruvato, lactato e razão NAD<sup>+</sup>/NADH. E, ainda, foram reunidos os resultados obtidos nos testes de expressão do *Pgc1α*, *Nrf1*, *Nfe2l2*, *Tfam*, *Tom20*, *Fis1*, *Drp1* e *Mfn2*. A seta sem o asterisco representa a comparação entre o grupo controle. A seta com o asterisco representa a comparação entre o grupo exposto somente a hipóxia.

**Tabela 5: resumos dos resultados – seção neurônios SHR**

Neurônios SHR - TABELA DE RESULTADOS - Investigação do metabolismo mitocondrial e qPCR									
* em relação a hipóxia									
EXPERIMENTO	CoCl <sub>2</sub> 800 μM	CoCl <sub>2</sub> 800 μM				CoCl <sub>2</sub> 2 mM	CoCl <sub>2</sub> 2 mM		
		NAM (50 μM)	RSV (0.5 μM)	SIRT (5 μM)			NAM (50 μM)	RSV (0.5 μM)	SIRT (5 μM)
FLUO-3 (Ca <sup>2+</sup> citosólico)	↓	↓ e ↑*	↓ e ↑*	↓ e ↑*		↓	↓ e ↑*	↓ e ↑*	↓ e ↑*
TMRE (Δψ <sub>m</sub> )	↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↓		↓	↓	↓	↓
DCF (ROS gerais)	↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
Mitosox (superóxido)	↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓		↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
MDA (peroxidação lipídica)	↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
ATP	↓	↓ e ↓*	↓	↓		↓	↓	↓	↓
PIRUVATO	↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
LACTATO	↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Pgc1α</i>	↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↑	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
<i>Nrf1</i>	↑	↓ e ↓*	↑	↑ e ↑*		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Nfe2l2</i>	↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑		↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*
<i>Tfam</i>	↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
<i>Tom20</i>	↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*
<i>Fis1</i>	↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↓	↓ e ↓*	↓	↓ e ↓*
<i>Drp1</i>	↓	↓ e ↓*	↓ e ↓*	↓ e ↓*		↓	↓	↓	↓
<i>Mfn2</i>	↓	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*		↑	↑ e ↑*	↑ e ↑*	↑ e ↑*

**Legenda:** Foram reunidos os resultados dos testes de função mitocondrial com Fluo-3-AM, TMRE, DCF, mitosox e MDA, bem como dos compostos de alta energia ATP, piruvato, lactato e razão NAD<sup>+</sup>/NADH. E, ainda, foram reunidos os resultados obtidos nos testes de expressão do *Pgc1α*, *Nrf1*, *Nfe2l2*, *Tfam*, *Tom20*, *Fis1*, *Drp1* e *Mfn2*. A seta sem o asterisco representa a comparação entre o grupo controle. A seta com o asterisco representa a comparação entre o grupo exposto somente a hipóxia.

## 4 DISCUSSÕES

Nessa seção iremos discutir os resultados obtidos ao longo desse projeto de maneira separada, primeiro os dos astrócitos, e depois dos neurônios de ratos Wistar e SHR tratados ou não ao tratamento com os moduladores de SIRT6 e expostos a hipóxia química moderada ou intensa.

### 4.1 Discussão astrócitos

Ao longo do projeto, mostramos que a modulação das SIRT6 acarretou, em astrócitos primários do córtex de animais controle Wistar e SHR após a exposição a hipóxia química, à acetilação de histona 3 lisina 9 (H3K9ac), aumento da viabilidade celular, hiperpolarização do MMP, alteração da capacidade de tamponamento de cálcio citosólico e/ou retenção do cálcio mitocondrial, diminuição dos níveis de superóxido, e aumento da expressão de genes responsáveis pela regulação do metabolismo e conteúdo mitocondrial, como *Nrf1* e *Nfe2l2*, e do gene utilizado como marcador de quantidade mitocondrial *Tom20*. Em conjunto, nossos achados sugerem um potencial efeito neuroprotetor da modulação das SIRT6 contra a hipóxia. Como o SHR é considerado um modelo animal SZ, especulamos que nossos dados também podem ser relevantes para a terapia clínica associada à SZ.

Neste estudo, primeiro investigamos o efeito dos moduladores de SIRT6 (NAM, Rsv e Sir) na regulação epigenética e viabilidade celular na presença ou ausência de  $\text{CoCl}_2$  (Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Nesse caso, vimos que o NAM, Rsv e Sir, sozinhos, induziram um aumento na morte celular de uma maneira dependente da dose em células sem tratamento (Wistar e SHR) (Figura 4 e 5). Esse efeito pode estar relacionado a uma hiperacetilação e, conseqüentemente, à inativação de proteínas importantes para a função celular, como a proteína de ligação ao elemento de resposta de cAMP (CREB), *Forkhead Box O3* (FOXO3) e o PGC1 $\alpha$ , aumentando assim a morte celular (Naia et al., 2017a,b; Dai et al., 2018; Tinkov et al., 2021).

Notavelmente, as concentrações propostas dos moduladores promoveram a sobrevivência celular contra a hipóxia química (Fig. 6 e 7). Em relação à modulação epigenética, observamos que os tratamentos com NAM (50  $\mu\text{M}$ ), Rsv (0,5  $\mu\text{M}$ ) e Sir (5  $\mu\text{M}$ ) aumentaram a razão AcH3k9/H3K9 (Figuras 8 e 9). Assim, propomos que tal efeito protetor pode estar relacionado a esse aumento da acetilação da histona 3 lisina 9, conforme já observado em outros trabalhos (Naia et al., 2017a,b; Naia et al., 2021). É importante ressaltar que quando essa região (histona 3 lisina 9) é acetilada,

a cromatina assume um estado permissivo, o que leva à transcrição gênica, regulando uma ampla gama de funções celulares e mitocondriais (Qiao et al., 2015; Naia e Rego, 2015; Naia et al., 2017a,b; Mohammed et al., 2020; Ye et al., 2021).

É importante notar que as evidências mostram que a hipóxia controla o estado da cromatina através da ativação do HIF1 $\alpha$ . Consequentemente, suprime genes que atuam em vias metabólicas na presença de O<sub>2</sub> e ativa genes que atuam na compensação metabólica, visando garantir a homeostase energética da célula (Liu e Lee, 2014; Ma et al., 2014; Batie et al. 2018). A hipóxia também pode diminuir a acetilação no H3K9 enquanto aumenta sua hipermetilação, o que foi relatado como um marcador de repressão da transcrição gênica (Lu et al., 2011; Batie et al., 2019; Kindrick e Mole, 2020; Kim et al., 2022). De fato, vários estudos relataram os benefícios do pré-tratamento NAM, Rsv e Sir contra a morte celular em modelos de doenças neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento (Orrechia et al., 2011; Smith et al., 2014; Naia et al., 2017a,b; Song et al., 2017; Harrison et al., 2019; Chandramowlishwaran et al., 2020; Niu et al., 2020). Portanto, a presença de moduladores de SIRTs pode estar interferindo no equilíbrio da transcrição gênica e, conseqüentemente, na viabilidade celular.

Como é sabido que as mudanças epigenéticas interferem na função mitocondrial (Rosenstock et al., 2013; Naia e Rego, 2015; Naia et al., 2017a,b; Carafa et al., 2016; Song et al., 2017; Calió et al., 2020), e que esta, por sua vez, está relacionada diretamente a sobrevivência celular, avaliamos, em seguida, a homeostase do cálcio citosólico na presença dos moduladores. As figuras 10 A e B mostram que em astrócitos primários do córtex de animais Wistar submetidos a intensa hipóxia, apresentam um aumento da captação de cálcio pelas mitocôndrias. Importante lembrar, aqui, que o aumento do acúmulo de Ca<sup>2+</sup> nas mitocôndrias também pode causar despolarização de MMP (Kowaltowski et al., 2019), parâmetro que abordaremos mais adiante. Esses dados podem refletir um mecanismo de proteção contra o acúmulo de íons Ca<sup>2+</sup> no citosol (E Silva et al., 2019). De fato, sabe-se que células em hipóxia tendem a acumular Ca<sup>2+</sup> no citosol (Berna et al., 2001; Berchner-Pfannschmidt et al., 2004; Angelova et al., 2015; Lumb, 2017), levando à ativação de vias de morte (Smali et al., 2009; Lumb, 2017). Assim, o acúmulo de cálcio mitocondrial após hipóxia intensa pode ser uma resposta ao aumento do cálcio citosólico. Além disso, todos os moduladores de SIRTs favorecem um aumento da captação de cálcio mitocondrial nas células controle sugerindo um

efeito protetor nos astrócitos controle tratados com os moduladores (Figuras 10 A e B).

Em astrócitos SHR, a hipóxia química moderada e intensa causam também um aumento na captação mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este efeito parece estar relacionado ao estado de pré-condicionamento dos astrócitos SHR, o que parece favorecer uma melhor regulação entre a razão de cálcio citosólico e mitocondrial, evitando acúmulo no citosol. No entanto, este efeito só é intensificado pelo NAM após  $\text{CoCl}_2$  2 mM (Figuras 10 A e B). De forma interessante, um estudo com fibroblastos mostrou que 5 mM de NAM induziu um aumento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico através da ativação do processo de fissão mitocondrial (Song e Park, 2021). Apesar de não termos analisado esse processo especificamente, observamos um aumento no conteúdo mitocondrial em astrócitos SHR (Figura 18) e em E Silva et al., 2019. Vale mencionar que o tratamento Rsv não causou nenhum efeito além da hipóxia química.

Especificamente sobre a influência do tratamento com Sir, observamos uma diminuição significativa na captação de cálcio mitocondrial, que pode estar relacionada à sua interação específica com a sirtuína 1 e, como consequência, com HIF1 $\alpha$  (Laemmle et al., 2012; Balaiya et al., 2012; Ryu et al., 2019). Braidy e colaboradores mostraram que o tratamento com Sir em astrócitos humanos (e neurônios) pode inibir a sirtuína 1 em 90 e 80%, respectivamente (Braidy et al., 2011). Na hipóxia química ( $\text{CoCl}_2$ ), Sir regulou negativamente o nível de sirtuína 1 para 31,6% (Balaiya et al., 2012). Isso pode estar relacionado ao efeito não benéfico de Sir nos experimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  sob hipóxia intensa, pois os astrócitos SHR poderiam necessitar mais da estabilização HIF1 $\alpha$  do que os astrócitos Wistar (Figuras 10 A e B).

Como as alterações nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  podem modificar o potencial de membrana mitocondrial (MMP), ele foi investigado nos astrócitos submetidos à hipóxia química na presença ou ausência de moduladores de SIRTs. Assim, mostramos que os astrócitos expostos ao  $\text{CoCl}_2$  apresentavam mitocôndrias despolarizadas, e que tal desfecho foi resgatado na hipóxia química moderada pelos moduladores NAM e Rsv em células de animais controle (Figuras 11 A e B). O observado com o tratamento com NAM já havia sido correlacionado com a acetilação de histonas, a consequente diminuição na formação de heterocromatina e a recuperação de MMP (Naia et al, 2017a,b). Da mesma forma, o papel protetor de Rsv e Sir na viabilidade celular também foi previamente correlacionado com a

inibição da despolarização de MMP (Lin et al., 2014; Arteaga, 2015; Akyuva e Naziroglu, 2020; Zheng et al., 2020). Apesar da existência de tais achados, nosso trabalho é o primeiro a descrever o potencial benefício do tratamento com moduladores de SIRT6 contra a perda de MMP induzida por hipóxia química em astrócitos.

Curiosamente, os moduladores de SIRT6 não promoveram o mesmo efeito em relação à MMP em astrócitos SHR (Figura 11 A e B). Esses dados, embora não pareçam tão promissores, precisam ser interpretados como são, o que significa que essas células podem ser mais tolerantes aos moduladores de SIRT6, uma vez que já experimentaram hipóxia intrauterina como um estado de pré-condicionamento (Ritz et al., 2012; Marina et al., 2017; Neckář et al., 2017; Hefter et al., 2018; Hong et al., 2019; E Silva et al., 2019). Como mencionamos, a hipóxia reduz o H3K9ac e aumenta o H3K9me, o que é desfavorável à transcrição gênica. Além disso, os inibidores de SIRT6 podem causar uma diminuição no acúmulo e estabilização do HIF1 $\alpha$ , especificamente pela inibição da sirtuína 1 que, por sua vez, deacetila a lisina 674 do HIF1 $\alpha$  ativando-o (Laemmle et al., 2012; Leiser e Kaeberlein, 2010; Lim et al., 2010; Ryu et al., 2019).

Portanto, se esse estado pré-condicional das mitocôndrias SHR está ligado ao aumento natural da expressão de HIF1 $\alpha$ , como observado em E Silva et al., 2019, inibindo a atividade de HIF1 $\alpha$  e alterando o estado da H3K9 para acetilado (que deveria estar mais metilado pela ação da hipóxia), potencialmente poderia desestabilizar essa sua pré-adaptação. No entanto, isso não significa que essas células sejam um caso perdido. A modulação de SIRT6 aumentou a viabilidade celular de astrócitos SHR quando submetidos a hipóxia adicional e mais intensa na presença de CoCl<sub>2</sub> (Figura 7 A e B), o que pode estar relacionado a outros potenciais efeitos benéficos.

Para investigar melhor a ação dos moduladores de SIRT6 na função mitocondrial, verificamos os níveis de geração de superóxido mitocondrial (Figuras 12 A e B). Nossos dados mostram que NAM e Rsv reduziram, significativamente, os níveis de superóxido em astrócitos SHR submetidos à hipóxia química. No entanto, não foi observada redução significativa nos astrócitos Wistar após a modulação das SIRT6. Entretanto, como mostramos que os astrócitos SHR apresentam um aumento significativo dos níveis de superóxido em comparação com as células Wistar (E Silva, et al., 2019), presumimos que as respostas dos astrócitos SHR aos

moduladores de SIRT6 e  $\text{CoCl}_2$  podem ser resultado de seu pré-condicionamento a hipóxia. De fato, a própria hipóxia aumenta a geração de superóxido pelo complexo III, e o ânion é importante para regular a estabilização e acúmulo de HIF, respondendo prontamente a uma situação de estresse (Semenza et al., 2012; Chen et al., 2018; Santos, 2021). Assim, os astrócitos SHR parecem regular especificamente o status ROS-HIF após modulação da SIRT6, mantendo suas características mitocondriais estáveis para produzir energia, mesmo em circunstâncias estressantes, o que potencialmente aumenta sua chance de sobrevivência.

A literatura nos mostra que um aumento na acetilação da região da histona 3 lisina 9 está correlacionado com um aumento da função mitocondrial e proteção contra o estresse oxidativo por um aumento nas defesas antioxidantes (Yu et al., 2016; Adamkova et al., 2017; Currais et al., 2019; Bradshaw, 2021). Por conta disso, também investigamos o sistema antioxidante em nossos modelos. O sistema antioxidante está diretamente implicado na desintoxicação de células de diferentes tipos de radicais livres (Wang et al., 2018; Gureev et al., 2019), e a expressão de *Nfe2l2* é uma forma de demonstrar tal atividade (Pantoja et al., 2016; Wang et al., 2018; Gureev et al., 2019).

Como podemos observar nas Figuras 17 A e B, a expressão de *Nfe2l2* após 2 mM de  $\text{CoCl}_2$  está diminuída em astrócitos Wistar e SHR em relação aos grupos não tratados. Como sugerimos anteriormente, a hipóxia leve poderia favorecer a resposta antioxidante (E Silva et al., 2019), enquanto a hipóxia intensa tem sido relacionada à redução de *Nfe2l2* devido a uma falha na translocação do gene para seu sítio de ligação no núcleo, reduzindo a transcrição de fatores secundários da cascata antioxidante (Pantoja et al., 2016; Liu e Knowlton, 2016; E Silva et al., 2019).

Significativamente, os moduladores de SIRT6 aumentaram a expressão de *Nfe2l2* em todos os tipos de células (subjugadas a hipóxia moderada e intensa), sugerindo um potencial mecanismo de proteção antioxidante (Figuras 17 A e B). Tal resultado parece corroborar os níveis de superóxido observados nas Figuras 12 A e B. Interessantemente, o *Nfe2l2* pode ser estimulado pelo status H3K9ac. Foi observado que a ligação de *Nfe2l2* à região ARE no núcleo pode ser inativada pela metilação de H3K9, como ocorre na hipóxia (Kindrick e Mole, 2020). No entanto, os moduladores de SIRT6 parecem neutralizar esse efeito, promovendo H3K9ac, levando à ativação de *Nfe2l2* (Cheng et al., 2016; Kindrick e Mole, 2020; Moreno et

al., 2020). Portanto, os astrócitos SHR poderiam ser beneficiados por esse processo, uma vez que suas mitocôndrias estavam “acostumadas” a lidar com níveis mais elevados de ROS devido à hipóxia intrauterina, demonstrando assim outro papel protetor dos moduladores de SIRT6.

Para entender se os moduladores de SIRT6 aumentaram a viabilidade dos astrócitos por meio de alterações na biogênese mitocondrial, também avaliamos a expressão de *Nrf1*, um fator responsável pela transcrição de várias proteínas da cadeia de transporte de elétrons codificadas no núcleo (Kiyama et al., 2018). Conforme observado nas análises do *Nfe2l2*, detectamos um declínio significativo na expressão de *Nrf1* em astrócitos Wistar e SHR após hipóxia química intensa (2 mM) (Figuras 14 A e B). Esses dados nos ajudaram a levantar uma hipótese de que a hipóxia intensa diminui o conteúdo das subunidades dos complexos mitocondriais, consequentemente levando a uma diminuição do metabolismo e da energia celular. Como esperado, NAM, Rsv e Sir aumentaram a expressão do *Nrf1* (em todos os grupos), implicando em uma regulação positiva na transcrição dos fatores relacionados com os complexos mitocondriais, que poderia estar ocorrendo para melhorar a função mitocondrial.

Interessantemente, alguns estudos mostraram que a expressão de *Nrf1* está associada exclusivamente a um status de eucromatina, especificamente quando H3K9 é acetilado (Weaver et al., 2017; Gureev et al., 2019; Senapati et al., 2019). Além disso, a perda de MMP e o estresse oxidativo, apesar de serem sinais de morte celular, também podem favorecer a via de biogênese mitocondrial que promove a sobrevivência celular e que pode refletir na regulação positiva de *Nrf1* (Crompton et al., 2002; Gnaiger, 2014; Choi et al., 2014; Smaili et al., 2009; Bouchez e Devin, 2019).

Quando analisamos em nosso modelo a expressão do *Pgc1 $\alpha$* , o regulador central da via de biogênese mitocondrial, observamos um aumento em sua expressão apenas sob hipóxia intensa nos astrócitos Wistar (Figura 13 B). Inesperadamente, a modulação das SIRT6 não induziu quaisquer alterações em astrócitos Wistar, mas causou uma diminuição da expressão do fator, em astrócitos SHR expostos a hipóxia química intensa (Figura 13 B). É importante notar que, em 2019, observamos que a hipóxia neonatal por si só poderia induzir aumento na expressão de *Pgc1 $\alpha$*  em astrócitos SHR (E Silva et al., 2019). Apesar de ser contraditório, os pesquisadores têm sugerido que a biogênese mitocondrial pode



ocorrer após a estimulação de *Nfe2l2* (Piantadosi et al., 2008, Calvert et al., 2010; Lee et al., 2017; Gureev et al., 2019). A via da biogênese dependente de *Nfe2l2* está relacionada à capacidade do fator de se ligar a AREs na região promotora do gene *Nrf1*, aumentando sua expressão e, assim, aumentando o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), que está diretamente envolvido na replicação do DNA mitocondrial (Lee et al., 2017; Gureev et al., 2019). De fato, observamos um aumento na expressão de *Tfam* após o tratamento com os moduladores Sirts (Figuras. 15 A e B). Além disso, *Nrf1* e *Nfe2l2* também regulam a expressão de vários componentes da cadeia de transporte de elétrons (ETC), e *Nfe2l2*, sozinho, regula a expressão da translocase da membrana mitocondrial externa 20 (TOM20) (Blesa et al., 2007; Gureev et al., 2019), que também está com sua expressão aumentada após os tratamentos com os moduladores (Figuras 16 A e B). Esses resultados sugerem um aumento no conteúdo mitocondrial independente da regulação de *Pgc1 $\alpha$* , o que poderia beneficiar a viabilidade dos astrócitos primários do córtex de animais SHR e Wistar.

Em contraste, alguns estudos reforçam a necessidade de *Pgc1 $\alpha$*  para a biogênese mitocondrial (Lee et al., 2017; Gureev et al., 2019). Como nossos dados não corroboram esse fato, podemos supor que a ativação da *Pgc1 $\alpha$* , na qual é necessária a desacetilação via sirtuína 1 (Cantó e Auwerx, 2009), não está ocorrendo, pois os moduladores de SIRTs promovem a inibição da atividade de desacetilação das sirtuínas, o que levaria a degradação do *Pgc*. No entanto, o próprio *Nfe2l2* parece ativar os membros do receptor ativado por proliferadores de peroxissomo (PPARs), especialmente o PPAR $\gamma$  (Corona e Duchon, 2016; Lee et al., 2017). Membros dessa família, como PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$ , são extremamente necessários para a regulação da homeostase energética celular e, conseqüentemente, da biogênese mitocondrial (Lee et al., 2017). Além disso, o PPAR $\gamma$  tem sido relacionado como um alvo terapêutico para resgatar a função mitocondrial em doenças neurológicas, melhorando suas defesas antioxidantes e estimulando sua biogênese (Corona e Duchon, 2016).

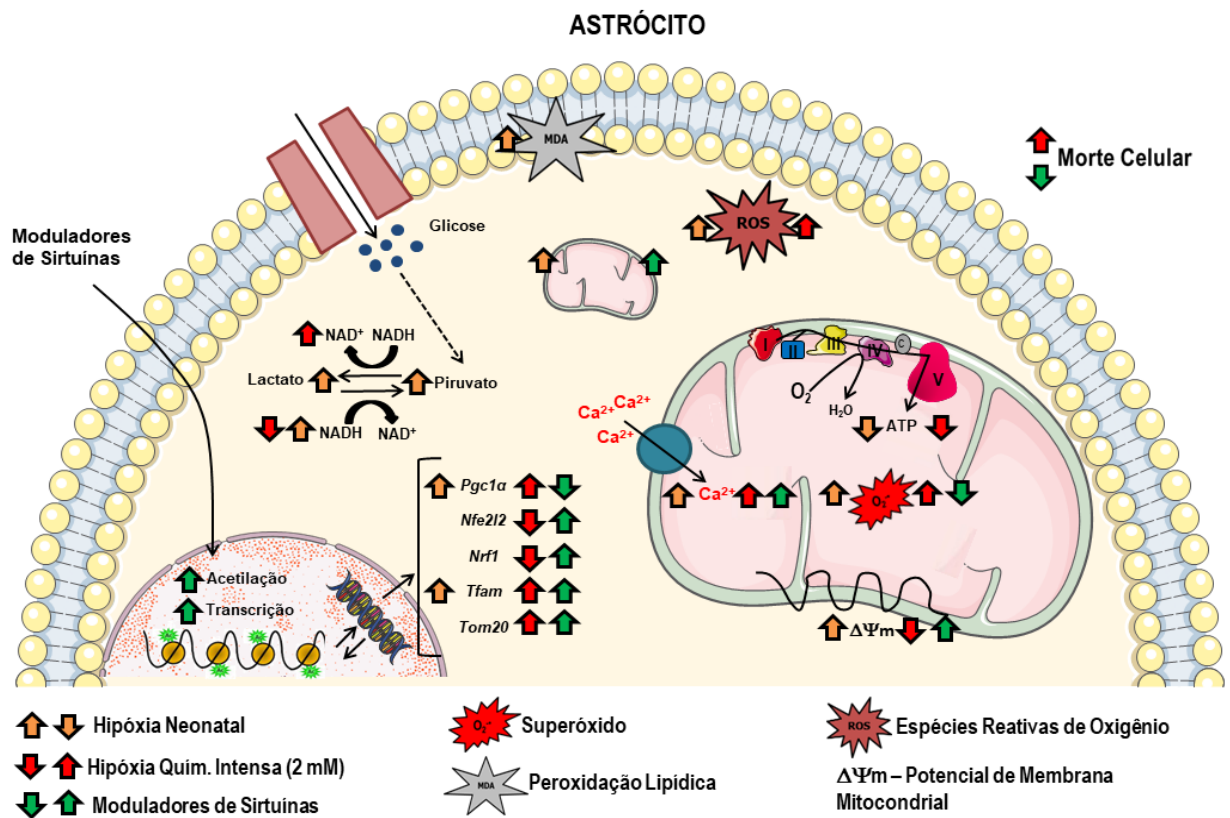
Portanto, a modulação epigenética do H3K9 poderia levar à neuroproteção em células submetidas à hipóxia (química ou neonatal) como resultado de alterações no estado da cromatina e, conseqüentemente, na função mitocondrial. Especificamente, a modulação de SIRTs poderia promover um aumento na viabilidade celular através de um aumento no sistema de desintoxicação e um

aumento da expressão de genes relacionados a biogênese mitocondrial como, *Nfe2l2*, *Nrf1*, *Tfam* e *Tom20*. Nos astrócitos Wistar, a modulação epigenética parece melhorar a capacidade de lidar com o estresse causado pela hipóxia, ou seja, condicioná-lo a lidar melhor com a deficiência energética ao resgatar a perda de MMP, aumentar a captação de cálcio mitocondrial e promover a biogênese mitocondrial. Nos astrócitos SHR, essa modulação parece aumentar sua capacidade inata de lidar com a hipóxia, diminuindo os níveis de ROS e aumentando a captação de cálcio mitocondrial.

#### **4.2 Conclusões - astrócitos**

Ao todo, nossos dados mostram que a modulação epigenética através da modulação de SIRT6 pode mitigar os danos desproporcionais nas mitocôndrias causados pela hipóxia, aumentando a acetilação de H3K9 (Figura 55). Tal achado é relevante não apenas para condições ligadas à hipóxia, denominadas traumatismo cranioencefálico, acidente vascular cerebral, convulsão e pré-eclâmpsia, mas também para a SZ, uma vez que a hipóxia pré-natal é um fator ambiental relacionado a distúrbios neuropsiquiátricos (Nalivaeva et al., 2018; Jones e Thornton, 2022; E Silva et al., 2019; Calió et al., 2020; Liu et al., 2020).

**FIGURA 55:** Imagem resumo dos resultados encontrados na cultura primária de astrócitos de animais controle (Wistar) e SHR submetidos a hipóxia química e tratadas previamente com os moduladores de SIRTs



**Legenda:** Setas laranjas indicam as alterações provocadas pela hipóxia neonatal observadas em E Silva et al., 2019. Setas vermelhas demonstram as alterações provocadas pelas condições de hipóxia química intensa (CoCl<sub>2</sub> 2 mM) em astrócitos Wistar e SHR. As setas verdes indicam as alterações provocadas pelo tratamento prévio com os moduladores de SIRTs (NAM 50 μM Rsv 0.5 μM e Sir 5 μM) e posterior exposição a hipóxia química intensa (CoCl<sub>2</sub> 2 mM) em astrócitos Wistar e SHR.

ADAPTAÇÃO DA FONTE: Araújo et al., 2021

### 4.3 Discussão neurônios

No início dessa seção, discutiremos os resultados obtidos entre os neurônios do córtex de animais Wistar e SHR.

Demonstramos, em primeiro lugar, os níveis de *Hif1α* e *Vegf* para corroborar que o modelo SHR estava hipoxiado. De fato, houve um aumento na expressão de *Hif1α* e *Vegf* (Figura 29 A e B) nos neurônios primários de animais SHR em relação aos animais controle, indicando que seu metabolismo está ligado a um perfil natural de hipóxia. Sabe-se que o *Hif1α* é expresso constitucionalmente, mas é degradado quando as células estão em estado de normoxia. O *Vegf*, por outro lado, é sempre expresso após a ativação do *Hif1α* e, em nosso projeto, funciona como um fator de confirmação da estabilização do *Hif1α* (Semenza et al., 2012, 2014; Fuhrmann e Brune, 2017; E Silva et al., 2019; Eyles et al., 2021). Apesar de ser estranho que o complexo HIF seja ativado com a presença de O<sub>2</sub> atmosférico, alguns relatos mostram que a disfunção mitocondrial pode levar à ativação de *Hif1α*, pois um prejuízo na utilização de O<sub>2</sub> pelas mitocôndrias e um aumento na geração de ROS poderia reduzir a capacidade de detecção de O<sub>2</sub> das células estimulando, assim, um estado de pseudo hipóxia, ou efeito Warburg (glicólise aeróbica) (Mansfield et al., 2005; Hayashi et al., 2019; Bao et al., 2021).

Avaliando a função mitocondrial dos neurônios submetidos a hipóxia neonatal, vemos que suas mitocôndrias acumulam menos Ca<sup>2+</sup> (Figura 32 B); isso também acontece extensivamente em neurônios Wistar e SHR após hipóxia química (Figura 36 A e B). De fato, sabe-se que o estado de hipóxia estimula o acúmulo de Ca<sup>2+</sup> no citosol pela inibição do canal aniônico dependente de voltagem (VDAC) mitocondrial, que é importante para regular a atividade de uma enzima chave na via da glicólise, a glicose-6-fosfato (G6P) (Lemeshko et al., 2015; Angelova et al., 2015; Lumb, 2017; Dejos et al., 2020). Além disso, ao bloquear a capacidade de acúmulo de Ca<sup>2+</sup> pelas mitocôndrias, as células evitam a sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial, a despolarização do MMP e, conseqüentemente, a sinalização para a morte celular (Kowaltowski et al., 2019; Dejos et al., 2020). Isso parece ser exatamente o que está acontecendo nos neurônios submetidos à hipóxia neonatal e química. No entanto, vale ressaltar que o acúmulo citosólico de Ca<sup>2+</sup> também pode ser um sinal de morte celular (Kowaltowski et al., 2019). Contudo, como a homeostase de Ca<sup>2+</sup> deve ser regulada com precisão, outras organelas, como o retículo endoplasmático (RE),

devem estar participando deste processo. Especificamente aqui neste estudo, o papel do RE não foi avaliado.

Como sabe-se, o  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial pode afetar a polarização do MMP (Orrenius et al., 2003; Smaili et al., 2009; Kowaltowski et al., 2019; E Silva et al., 2019). Por conta disso, nós investigamos esse parâmetro. Pudemos observar um aumento no sinal de fluorescência citosólica de TMRE após FCCP nos neurônios submetidos à hipóxia neonatal (SHR), em relação aos neurônios controle, indicando a polarização do MMP (Figura 32 A). No entanto, esse aumento de sinal pode estar relacionado também com o aumento no conteúdo das mitocôndrias (Figuras 35), já que, teoricamente, com a alteração de cálcio observada, este resultado não seria concordante. De fato, nossos dados sugerem que os neurônios SHR poderiam ter mais mitocôndrias, pois vemos o aumento da expressão do *Pgc1 $\alpha$* , *Nrf1*, *Tfam* e *Tom20* (Figuras 35), assim como observamos nos astrócitos em E Silva et al., 2019 - voltaremos a estes dados mais adiante. Sendo assim, com mais organelas, elas, no total, poderiam acumular mais TMRE mesmo que suas mitocôndrias estivessem despolarizadas.

Na hipóxia química, as mitocôndrias de ambos os grupos de neurônios (Wistar e SHR) foram incapazes de sequestrar o TMRE, sugerindo uma despolarização após o  $\text{CoCl}_2$  (Figura 37). Julgando que as mitocôndrias dos animais SHR sem tratamento estivessem, de fato despolarizadas, podemos dizer que o estado de hipóxia (neonatal ou química) altera o perfil do metabolismo mitocondrial, o que diminui a OXPHOS que, por sua vez, desestabiliza a cadeia de transporte de elétrons (ETC) favorecendo o desacoplamento de elétrons e causando então a despolarização do MMP observada (Sanderson et al., 2015; Fuhrmann e Brune, 2017; Eyles et al., 2021). Nesse sentido, observar a despolarização do MMP após o estado de hipóxia era esperado.

Em relação aos níveis de estresse oxidativo, nossos dados apontam para um aumento de ROS após hipóxia neonatal e química (Figuras 32 C e 38 A e B). Esse aumento de ROS, em ambos os cenários, podem ser favorecidos pela possível ativação de um dos genes alvos do *Hif1 $\alpha$* , a nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX), e pelo desacoplamento de elétrons na cadeia de transporte de elétrons causada pela inibição da OXPHOS (ETC) (Fuhrmann e Brune, 2017; Chen et al., 2018; Eyles et al., 2021). Vale ressaltar, porém, que esses ROS são importantes para regular a estabilização do próprio *Hif1 $\alpha$*  (Chen et al., 2018).

Então, especificamente para o caso de hipóxia neonatal, o aumento de ROS poderia perpetuar um estado glicólico pela estabilização do *Hif1α* nesses neurônios (Forrester et al., 2018; Eyles et al., 2021).

Especificamente em relação aos níveis de superóxido, vemos que no grupo de hipóxia neonatal (SHR) houve uma diminuição de seu sinal em relação ao grupo controle (Wistar) (Figura 32 D). A diminuição observada em neurônios SHR pode estar relacionada à inibição de OXPHOS, que conseqüentemente não favorece a geração de superóxido mitocondrial (Eyles et al., 2021). Outra possível explicação é a degradação enzimática do superóxido para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela superóxido dismutase, sistema glutatona peroxidases, catalase e peroxirredoxinas, o que poderia também refletir no sinal DCF observado (Pantoja et al., 2016), entretanto não foram feitas análises nesse sentido.

Em contraste, a hipóxia química tanto nos Wistar, quanto nos SHR, parece aumentar a formação deste radical (Figura 39 A e B), o que pode estar relacionado ao próprio estado de falta de O<sub>2</sub>, como observado após um estado de hipóxia agudo (Hernandez-Augustin et al., 2014). Outra possível explicação é a indução via *Hif1α* da NADPH oxidase 1 e 2, um grande gerador de superóxido além das mitocôndrias (Chan et al., 2004).

Nossos dados também apontam para um aumento na expressão do fator *Nfe2l2* em neurônios submetidos a hipóxia neonatal (Figura 35) e uma redução na expressão do fator *Nfe2l2* em neurônios SHR após hipóxia moderada e intensa (Figura 51 A e B). O *Nfe2l2* é um fator de transcrição relacionado com a expressão de diversas enzimas antioxidantes (Pantoja et al., 2016; Liu e Knowlton, 2016; E Silva et al., 2019). Nesse caso, a sua redução poderia explicar o aumento brusco de ROS após hipóxia química. Ainda, esses dados poderiam explicar um mecanismo compensatório balanceado entre a expressão do *Nfe2l2* e eliminação de superóxido em neurônios SHR em condições normais.

Uma consequência do aumento de ROS é a peroxidação lipídica (Ayala et al., 2014), por conta disso fomos investigar os níveis do subproduto dessa reação de peroxidação de lipídeos, o malondialdeído (MDA). Em neurônios SHR sem qualquer tratamento e em relação aos neurônios de animais Wistar, os níveis de MDA estão aumentados (Figura 33). Tal resultado poderia ser explicado pelo fato das células SHR terem passado por uma condição de hipóxia intra útero (Mattace et al., 2008)

tornando-se condicionadas a lidar com esse estímulo - vamos falar um pouco mais sobre isso abaixo.

Surpreendentemente, apesar do aumento de ROS e superóxido após hipóxia química, os níveis de MDA após  $\text{CoCl}_2$  estão diminuídos nos neurônios SHR, e nenhuma alteração foi observada nos Wistar (Figura 40). Tal dado pode ser devido ao metabolismo enzimático do MDA pela enzima fosfoglicose isomerase, transformando-o em metilglioxal (MG) (Ayala et al., 2014), que por sua vez, nosso kit não foi capaz de quantificar. Essa explicação pode fazer sentido, pois se a hipótese de que os SHR têm um aumento da sua capacidade glicolítica for verdadeira, a atividade da fosfoglicose isomerase, que é uma enzima chave da dessa via (conversão de G6P em frutose-6-fosfato) seria maior, o que conseqüentemente favorece a metabolização do MDA. Além disso, vimos que a expressão de *Nfe2l2* foi regulada positivamente em neurônios Wistar (Figura 53), sugerindo um possível aumento na capacidade antioxidante, o que refletiria na não alteração dos níveis de MDA. Outro ponto de vista relevante e mais prático, é o fato de as amostras terem sido extraídas em um determinado ponto no tempo em que nos neurônios Wistar simplesmente não havia formação de MDA. No caso da hipóxia neonatal, é importante notar que a hipóxia também estimula a fosfoglicose isomerase diretamente (Funasaka et al., 2005). Assim sendo, sem nenhuma exposição posterior à hipóxia, os neurônios SHR apresentariam níveis de MDA aumentados, quando comparados ao grupo controle, mas aumentar o *Hif1 $\alpha$*  após hipóxia química, também aumentará a atividade enzimática da fosfoglicose isomerase, o que possivelmente poderia diminuir os níveis de MDA, o que parece ser uma melhora em seu pré-condicionamento a hipóxia. No mesmo sentido, essa explicação também serve para os Wistar, mas sem o pré-condicionamento, aconteceria com menos eficiência.

Como vimos essas disfunções mitocondriais, fomos avaliar os níveis dos compostos altamente energéticos. Nesses ensaios vemos que os neurônios submetidos à hipóxia neonatal têm menos ATP (Figura 34 A), mas níveis aumentados de piruvato (Fig. 34 B), lactato (Fig. 34 C) e  $\text{NAD}^+$  (Fig. 34 D), todos indicativos de regulação positiva da glicólise (Fuhrmann e Brune, 2017; Magistretti e Alaman, 2018; Eyles et al., 2021). Da mesma forma, após a hipóxia química, os neurônios Wistar reduziram sua produção de ATP, aumentando também o piruvato e o lactato (Figuras 41, 42 e 43). Este resultado era esperado, pois o estado de

hipóxia inibe a capacidade mitocondrial da OXPHOS de gerar ATP estimula as enzimas glicolíticas (e o piruvato, por conseguinte) (Semenza et al., 2012, 2014; Fuhrmann e Brune, 2017; Eyles et al., 2021). Ainda, o aumento do lactato pode ser devido, a própria atividade aumentada da lactato desidrogenase (LDH) pela hipóxia regenerando NAD<sup>+</sup>, sendo também oxidado, regenerando o NADH (Semenza et al., 2012, 2014; Fuhrmann e Brune, 2017; Eyles et al., 2021). No entanto, a produção de ATP após hipóxia química em neurônios SHR é elevada em comparação com Wistar na mesma condição (Figura 41 A e B), isso pode estar relacionado a uma pré-condição para o estado de hipóxia do SHR que demonstrando uma alta capacidade de lidar com as posteriores adaptações induzidas pelo HIF.

Assim, até o momento, temos que os neurônios Wistar apresentam disfunções mitocondriais semelhantes aos neurônios SHR quando submetidos a hipóxia química. Ainda, os neurônios SHR estão, de fato, em um estado de hipóxia e, curiosamente, os animais SHR exibem um comportamento do fenótipo SZ (Peraçoli et al., 2001; Bassan et al., 2005; Calzavara et al., 2011; Peres et al., 2018; Niigaki et al., 2019; Hefter et al., 2018; E Silva et al., 2019; Wang et al., 2021). Nesse sentido, acreditamos fortemente que a hipóxia poderia estar relacionada a prejuízos no neurodesenvolvimento, alterando a função normal dos astrócitos (E Silva et al., 2019) e neurônios através de uma disfunção mitocondrial.

Em 2012 Ritz e colaboradores demonstraram que os animais SHR tem uma expressão gênica alterada devido à exposição crônica à hipóxia, o que modificaria intrinsecamente seu metabolismo (Ritz et al., 2012). Essas alterações poderiam favorecer um estado de pré-condição metabólica, permitindo que eles sobrevivessem. De fato, nossos dados revelam um potencial mecanismo para explicar essa hipótese. Observamos que os neurônios SHR (hipóxia neonatal) apresentaram aumento no processo de biogênese mitocondrial e no processo de fissão mitocondrial (Figuras 35), já que há um aumento da expressão dos fatores *Nrf1*, *Tfam* e *Tom20*, além do *Pgc1 $\alpha$*  (Weydt et al., 2006; Choi et al., 2014; Lavie et al., 2017). O *Nfe2l2*, fator antioxidante, como vimos, também foi regulado positivamente (Figuras 35), e também é estimulado pelo aumento de *Pgc1 $\alpha$*  e de ROS (Pantoja et al., 2016; Liu e Knowlton, 2016; E Silva et al., 2019). É importante notar que o aumento do conteúdo mitocondrial não é necessariamente bom para a célula, o que é importante é sua funcionalidade.



Curiosamente, quando os neurônios controle (Wistar) e SHR foram expostos a hipóxia química, o *Pgc1α* e *Nrf1* tiveram sua expressão elevada (Figura 45 e 46), um possível indicador de biogênese mitocondrial induzida por hipóxia química. No entanto, a expressão de *Tfam* e *Tom20* foram regulados negativamente (Figuras 47 e 48), o que poderia ser um indicativo de uma falha na conclusão do processo de biogênese mitocondrial ou até mesmo uma inibição desse processo (Ma et al., 2020). Uma maneira de explicar esses resultados é através de outra via essencial para as células, a fissão mitocondrial.

Em um estado de hipóxia, a fusão das mitocôndrias é inibida enquanto a fissão é regulada positivamente (Fuhrmann e Brune, 2017; Ma et al., 2020). Nossos resultados demonstram um aumento da expressão de *Fis1* que é importante para o recrutamento e ativação de *Drp1*, que também tem sua expressão estimulada em neurônios expostos a hipóxia neonatal (SHR) e em Wistar expostos à hipóxia química (Figuras 35 e Figuras 49). Concordante a isso, observamos uma redução de *Mfn2* após a hipóxia química moderada e intensa (Figura 50). A fissão gera mitocôndrias fragmentadas que beneficiam o mecanismo de reciclagem de organelas em excesso e/ou disfuncionais (Ma et al., 2020). De fato, a proteína HIF1α interage com a família do linfoma de células B2 (BCL2), aumentando a atividade da proteína 3 de interação com BCL2 (BNIP3) aumentando a mitofagia (Ma et al., 2020).

No caso SHR, nossos dados sustentam que neurônios primários do córtex desses animais expostos apenas à hipóxia neonatal, apresentam deficiência nas capacidades metabólicas mitocondriais e sugerem que a via da glicólise está aumentada, o que desequilibra sua homeostase redox, gerando estresse oxidativo e, conseqüentemente, aumentando a peroxidação lipídica. Em sentido contrário, disfunções mitocondriais em neurônios SHR parecem ativar mecanismos compensatórios, como biogênese, fissão e provavelmente mitofagia, na tentativa de evitar a morte celular. No entanto, no estado de hipóxia química, seu processo de fissão e biogênese parece bem equilibrado (estado de pré-condição) é interrompido e nenhum deles parece funcionar mais, o que possivelmente está relacionado à diminuição de sua viabilidade após a indução da hipóxia química (Figuras 23). Em condições normais, como os ratos SHR podem sobreviver e proliferar, esses mecanismos compensatórios ou fatores de pré-condição podem desempenhar um papel na vida dos animais, apesar de terem alterações em seu processo de

neurodesenvolvimento que possivelmente desencadeiam os comportamentos semelhantes aos transtornos neuropsiquiátricos, como a SZ.

No caso dos Wistar, o estado de fissão pode estar relacionado aos resultados observados nas análises de biogênese mitocondrial. Em teoria, como a hipóxia poderia influenciar na fissão e, conseqüentemente, na mitofagia (Sanderson et al., 2015. Ma et al., 2020), os neurônios Wistar tentam criar mais mitocôndrias aumentando a expressão de *Pgc1 $\alpha$*  e, conseqüentemente, *Nrf1*, porém, como suas mitocôndrias continuamente sofrem em estado de hipóxia química induzida, seu equilíbrio entre criação e degradação pode ser interrompido, e a expressão do *Tfam* e *Tom20* serão regulados negativamente.

Em ambos os cenários, os neurônios Wistar e SHR tem sua viabilidade diminuída após hipóxia química por desregulação da função mitocondrial e possível interrupção das capacidades de pré-condição das mitocôndrias, respectivamente (Figuras 23). Surpreendentemente, quando os neurônios de ambos os grupos foram previamente tratados com moduladores de SIRTos ocorreu uma estimulação da acetilação da histona 3 resíduo de lisina 9 (H3K9ac), promovendo uma diminuição na produção de ROS, superóxido e MDA, possivelmente pela regulação positiva da expressão de *Nfe2l2*, e, ainda, parece haver uma diminuição da fissão mitocondrial e um aumento no processo de fusão. Todos esses benefícios juntos parecem resgatar a viabilidade dos neurônios (Figuras 27 e 28). No entanto, vale lembrar que o tratamento com esses compostos, principalmente nos SHR, acaba também, diminuindo a viabilidade das células (Figura 24, 25 e 26). Como dissemos na seção de discussão dos dados de astrócitos, essa redução pode ser causada por uma hiperacetilação ou uma redução da ativação do HIF nos neurônios SHR, o que prejudicaria suas alterações induzidas pela hipóxia neonatal (Naia et al., 2017a,b; Dai et al., 2018; Tinkov et al., 2021).

Nossos dados revelam um aumento de H3K9ac após o tratamento com moduladores de SIRTos (Figuras 31). Notavelmente, os neurônios de SHR e Wistar tratados com esses moduladores aumentaram sua viabilidade (Fig. 27 e 28). Portanto, nesse tipo celular os moduladores de SIRTos podem estar causando uma modulação epigenética e interferindo no estado da cromatina, transcrição gênica e, conseqüentemente, aumentando a viabilidade celular. De fato, a H3K9 acetilada parece proteger as células por diversos mecanismos e estas, por sua vez, são cruciais para muitas funções neuronais (Bonnaud et al., 2016). Particularmente, a

acetilação das caudas das histonas está relacionada a um marcador positivo de transcrição gênica, pois neste estado, a cromatina relaxa assumindo um estado permissivo, favorecendo a transcrição gênica e regulando uma ampla gama de funções celulares (Qiao et al., 2015; Bonnaud et al., 2016; Naia e Rego, 2015; Naia et al., 2017a,b; Mohammed et al., 2020; Ye et al., 2021). Além disso, a acetilação da região histona 3 lisina 9 (H3K9ac) também é uma parte crucial do desenvolvimento do cérebro embrionário (Rollo et al., 2017). Em relação à função mitocondrial, o H3K9ac está correlacionado com um aumento desta, além da proteção contra o estresse oxidativo por um aumento nas defesas antioxidantes (Naia e Rego, 2015; Yu et al., 2016; Naia et al., 2017a,b; Adamkova et al., 2017; Currais et al., 2019; Bradshaw, 2021).

Em relação a análise do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, observamos que os moduladores de SIRTs aumentam a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  por essa organela nos neurônios SHR, sendo que o Rsv e Sir promoveram melhores resultados. No entanto, nenhum dos moduladores de SIRTs causou esse efeito em neurônios Wistar (Figuras 36 A e B). Como discutimos, um acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol acontece durante a hipóxia (Lemeshko et al., 2015; Angelova et al., 2015; Lumb, 2017; Dejos et al., 2020) e, por isso, os SHR naturalmente têm menor liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial na presença do FCCP (Figura 32 B). No entanto, parece estar acontecendo uma proteção promovida pelos moduladores de SIRTs contra a sobrecarga de cálcio citosólico, pois o conseqüente aumento na expressão de *Hif1 $\alpha$* , devido à hipóxia química, aumentará a quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol. Como os neurônios SHR parecem ter uma pré-condição a hipóxia, o mecanismo de retenção de cálcio pelas mitocôndrias, pode ter sido aumentado com os moduladores, ao contrário dos neurônios Wistar, que parecem sofrer de acúmulo citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ , já que não possuem essa tal pré-condição.

Em relação ao MMP, apenas a NAM e Rsv nos SHR parecem a impedir a despolarização do MMP causada pela hipóxia química, mas apenas em um cenário moderado ( $\text{CoCl}_2$  800  $\mu\text{M}$ ) (Figuras 37). Nenhum dos moduladores de SIRTs causa esse efeito nos neurônios Wistar. Alguns relatos mostraram que NAM, Rsv e Sir, por meio da acetilação de H3K9, inibem a despolarização de MMP aumentando a função mitocondrial (Naia et al, 2017a,b; Lin et al., 2014; Arteaga, 2015; Akyuva e Naziroglu, 2020; Zheng et al, 2020). No entanto, como não vemos nenhum benefício contra a hipóxia intensa em neurônios Wistar e SHR (Figuras 37), o aumento da

viabilidade dessas células pode estar relacionado a outras funções da mitocôndria que foram melhoradas.

Surpreendentemente, todos os moduladores de SIRT6, em ambos os tipos de neurônios, promoveram um efeito antioxidante, reduzindo os níveis de DCF, Mitosox e MDA (Figuras 38, 39 e 40). Os tratamentos com NAM, Rsv e Sir têm sido utilizados por suas propriedades antioxidantes em neurônios ou no sistema nervoso central como um todo (Singh et al., 2018; Rahman et al., 2020; Obrador et al., 2021). Em nossos experimentos, os efeitos antioxidantes parecem ser estimulados pela expressão e ativação de *Nfe2l2* (Figura 51). Ainda, como falamos, a acetilação de H3K9 promove a ligação de *Nfe2l2* na região ARE no núcleo (Cheng et al., 2016; Kindrick e Mole, 2020; Moreno et al., 2020).

Os moduladores de SIRT6 também aumentaram a geração de piruvato e lactato, e aumentaram a produção de ATP nos neurônios Wistar quando comparados aos neurônios expostos apenas à hipóxia (Figuras 41, 42 e 43). No caso dos SHR, vemos que há um aumento do piruvato e lactato, porém os níveis de ATP continuam os mesmos. E, investigando a relação  $NAD^+/NADH$ , podemos especular que a glicólise estaria mais intimamente controlada em ambos os neurônios (Wistar e SHR) após o tratamento com os moduladores (Figuras 44), já que as alterações da razão  $NAD^+/NADH$  pode demonstrar que esses compostos estão sendo utilizados e regenerados. Assim, os moduladores de SIRT6 parecem ampliar a atividade da via glicolítica, já que observamos o aumento de piruvato e lactato e, em conjunto com o potencial antioxidante aumentado, parecem promover a sobrevivência celular (Figuras 27 e 28).

Em relação a expressão de genes relacionados ao metabolismo, biogênese mitocondrial e dinâmica, todos os moduladores de SIRT6 diminuíram a expressão de *Pgc1 $\alpha$*  (Figura 45), *Tfam* e *Tom20* (Figuras 47 e 48) e aumentaram a expressão de *Nrf1* (Figura 46). Como o *Pgc1 $\alpha$*  deveria estimular o *Nrf1*, que consequentemente favorece a expressão de *Tfam* e *Tom20*, aumentando a quantidade de mitocôndrias, esses dados são contraditórios. Porém, uma das formas de explicar esses achados foi investigar a expressão de genes envolvidos na dinâmica mitocondrial. Em todos os casos, os moduladores de SIRT6 inibem genes relacionados ao processo de fissão mitocondrial e, ao mesmo tempo, aumentam a expressão de genes relacionados à fusão mitocondrial (Figuras 49 e 50). A fissão é um processo intrinsecamente relacionado às mitocôndrias despolarizadas e, como vimos, a

hipóxia a estimula (Ma et al., 2020). Nesse caso, a inibição da fissão e o aumento da fusão poderiam beneficiar a rede mitocondrial numa tentativa de aumentar a capacidade metabólica dessas mitocôndrias, seu potencial antioxidante e restaurar o MMP.

Nesse caso, os dados observados na expressão do *Pgc1 $\alpha$*  e *Nrf1* parecem ter um papel também relevante nesse quesito. Com a inibição da fissão e a regulação positiva da fusão, os neurônios não estão sendo estimulados a gerar novas mitocôndrias (Ma et al., 2020). No entanto, os moduladores de SIRTs não inibem a expressão do *Pgc1 $\alpha$* , mas diminuem sua expressão em comparação com o grupo exposto somente a hipóxia (Figura 45 A e B). Nesse sentido, com a fusão mitocondrial estimulada, haveria a necessidade do *Nrf1* que é impulsionado pelo *Pgc1 $\alpha$* , pois os componentes nucleares da maquinaria da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial estão correlacionados com o aumento da expressão do *Nrf1* (Figura 46 A e B) (Ma et al., 2020; Cardanho-Ramos e Morais, 2021). Vale relembrar que a expressão de *Nrf1* está associada ao status de eucromatina, como quando H3K9 é acetilado (Weaver et al., 2017; Gureev et al., 2019; Senapati et al., 2019). Assim, a “normalização” da expressão de *Pgc1 $\alpha$*  após o tratamento com os moduladores, pode estar acontecendo devido ao aumento da fusão, mas acaba estimulando o *Nrf1* e, também *Nfe2l2* (Figura 51) a responder prontamente ao aumento da massa mitocondrial (Figura 50) e ao aumento de ROS (Figuras 38, 39, 40), respectivamente (Ma et al., 2020; Cardanho-Ramos e Morais, 2021).

No entanto, o aumento da massa mitocondrial não significa necessariamente que as mitocôndrias sejam altamente funcionais. A análise de  $Ca^{2+}$  e MMP demonstra que sob tratamento com os moduladores de SIRTs, nenhum dos neurônios (Wistar e SHR) restaura completamente suas funções (Figuras 36 e 37). Além disso, nenhum deles tem os níveis ATP restaurados (Figura 41). Assim, podemos especular que o OXPHOS mitocondrial ainda está inibida, talvez porque as adaptações da hipóxia não tenham sido neutralizadas. No entanto, como recurso de proteção, o tratamento com moduladores de SIRTs parece beneficiar a via da glicólise, já que esta parece estar supra regulada pela condição de hipóxia, pois observamos um aumento na geração de piruvato e lactato (Figuras 42 e 43) e uma regulação da razão  $NAD^+/NADH$  (Figura 44). Ainda, é importante ressaltar que inibição da atividade de desacetilação das sirtuínas na região H3K9 também está

relacionada ao aumento do fluxo glicolítico em células em hipóxia (Etchegaray e Mostoslavsky, 2016), o que reforça nossas hipóteses.

#### **4.3.1 Função neural**

Quando observamos que a hipóxia neonatal ou química, modificativa a função as mitocôndrias, fomos investigar as proteínas relacionadas a função neuronal, e os nossos resultados indicam que na hipóxia neonatal há uma alteração dos níveis de proteínas pré-sinápticas, especificamente uma diminuição da sinaptofisina e um aumento da sinaptotagmina (Figuras 52). Ainda, houve um aumento da proteína pós-sináptica PSD95 (Figuras 52). Esses resultados levantam a hipótese de que há uma menor formação de vesículas já que no processo há a necessidade da proteína sinaptotagmina, porém há uma maior exocitose das vesículas formadas, uma vez que é necessário ter a sinaptotagmina para que haja a liberação ((Kießling et al., 2018).

Para a hipóxia neonatal (neurônios SHR), essa maior exocitose de vesículas pode estar relacionada com maior atividade sináptica nessas células, já que os níveis de PSD95 também estão aumentados neste grupo. Essa hipótese é corroborada com o que foi observado a respeito dos níveis de cálcio desse grupo (Figura 36 A e B). Isso porque uma maior quantidade de cálcio disponível no citosol pode acarretar maior atividade da sinaptotagmina, uma proteína Ca-dependente ligada a exocitose das vesículas sinápticas (Kießling et al., 2018). Entretanto, esse dado também pode refletir num aumento da liberação de glutamato, o que corrobora com o aumento do PSD95, já que essa proteína é relacionada à estabilidade dos receptores NMDA (Mukandala et al., 2016). De relevância, sabe-se que situações de hipóxia intra útero aumentam a liberação de glutamato pelos neurônios levando a um quadro de excitotoxicidade, o que aumentaria a morte neuronal (Mukandala et al., 2016).

De maneira análoga, quando os neurônios Wistar foram expostos a condição de hipóxia intensa, os níveis de proteínas pré-sinápticas (sinaptofisina e sinaptotagmina) eram similares, porém os níveis de PSD95 estavam menores (Figuras 53) em relação ao grupo sem tratamento. Nesse caso o aumento de vesículas sinápticas não parece refletir numa maior atividade sináptica, pois os níveis de PSD95 estão diminuídos (Figuras 53). De fato, resultados na literatura mostram que a indução de hipóxia *in vitro* ou *in vivo* é capaz de levar a diminuição

nos níveis de sinaptofisina (Milash et al., 2016; Yan et al., 2021; Xin et al., 2021) e PSD95 (Chen et al., 2006; Xin et al., 2021). Quando os neurônios SHR foram submetidos a condição de hipóxia intensa, vemos que há uma diminuição do PSD95 o que pode estar relacionado a própria indução da hipóxia química, mas contraditoriamente, observamos um aumento, em relação ao grupo sem tratamento, da sinaptofisina e sinaptotagmina, sugerindo que há mais formação e liberação de vesículas, porém, com uma menor atividade sináptica (Figuras 54).

Ainda, verificamos nesse trabalho que a hipóxia química e neonatal parece capaz de aumentar a poda neuronal, já que tanto os neurônios SHR sem tratamento, quanto os neurônios controle (Wistar) expostos a hipóxia química intensa, observa-se um aumento das proteínas plexina B1 e semaforina 3A (Figuras 53 e 54). Um *screening* de 1270 genes utilizando o modelo zebrafish mostrou que a hipóxia é capaz de modificar a expressão de genes envolvidos na formação de conexões neurais durante o neurodesenvolvimento. Como exemplo houve um aumento das proteínas semaforina e a plexina que foi correlacionado com uma diminuição de *axon guidance molecules* (AGMs) (migração dos neurônios e crescimento axonal) (Milash et al., 2016; Bonkowsky e Son, 2018). Entretanto, o exato mecanismo pelo qual a hipóxia é capaz de alterar a expressão dos genes e níveis de proteínas envolvidas no processo sináptico ainda não está elucidado (Bonkowsky e Son, 2018). Acredita-se que o *Hif1 $\alpha$*  tenha papel nessas modificações. Trabalhos utilizando roedores e zebrafish mostraram que as mudanças no desenvolvimento do neurônio e atividade sináptica são dependentes do HIF1 $\alpha$  e sua cascata de ativação (Curristin et al., 2002; Stevenson et al., 2012; Xing et al., 2015).

Observamos em nossos dados que o NAM, foi um composto que melhora a atividade das mitocôndrias Wistar e SHR, portanto testamos o modulador contra os efeitos da hipóxia sobre a função neural. Porém, antes disso, verificamos o que o tratamento com NAM poderia causar das células por si só. Assim, quando as células controle (Wistar) e SHR foram tratadas apenas com o NAM, por 48 horas, vemos um aumento nas proteínas de formação e liberação de vesículas, respectivamente sinaptofisina e sinaptotagmina, e um aumento na proteína de ancoragem PSD95 (Figuras 53 e 54). Esse dado sugere que o tratamento com o modulador de SIRT6 NAM aumenta a transmissão sináptica. De forma interessante, sabemos que o NAM promove a acetilação do resíduo de lisina 9 da histona 3 em nossos neurônios (Figura 31), e que a acetilação nesse resíduo é ligada a expressão dos genes da

sinaptofisina, sinaptotagmina e PSD95 (Ekici, et al., 2008; Xylaki et al., 2019), o que poderia explicar os achados.

Quando as células Wistar foram previamente tratadas com NAM e expostas a hipóxia, vemos que há uma diminuição da sinaptofisina e sinaptotagmina em relação ao grupo sem tratamento, exposto somente à hipóxia e ao NAM. Porém, os níveis de PSD95 aumentaram em relação aos mesmos grupos (Figuras 53). No caso dos SHR, também observamos uma redução da sinaptotagmina e sinaptofisina, em relação ao grupo sem tratamento, exposto somente à hipóxia e ao NAM, mesmo efeito observado nos Wistar (Figuras 54). Entretanto, no caso da proteína PSD95, vemos um aumento em relação ao grupo exposto somente a hipóxia (Figuras 54). Esses dados sugerem que há uma melhora na formação e liberação de vesículas quando as células foram previamente tratadas com NAM, talvez um efeito protetor em relação à hipóxia. No caso da transmissão sináptica, proteína PSD95, nos Wistar o tratamento prévio com NAM, aumenta sua capacidade de transmissão, enquanto nos SHR parece haver uma normalização, que outrora estava elevada pela hipóxia. No caso das proteínas da poda neural, vemos que há uma redução da plexina, ligante da semaforina, em todos os casos, o que poderia sugerir um mecanismo protetor contra o excesso de *pruning*. Todavia, há uma escassez de dados na literatura sobre esses parâmetros em neurônios primários submetidos a hipóxia neonatal e química, portanto, por ora, só podemos inferir no que estaria acontecendo;

#### **4.4 Conclusões - Neurônios**

Ao todo, nossos resultados demonstram, pela primeira vez, uma mudança na via metabólica constitucional em neurônios primários de animais SHR, ratos submetidos a hipóxia neonatal. Vimos que esses neurônios parecem possuir mecanismos compensatórios para lidar com o estado de hipóxia intra uterino, como aumento do conteúdo mitocondrial (visto por qPCR) e alteração de proteínas importantes para a função neural, o que é extremamente necessário para a atividade neuronal e que pode ser correlacionado com os comportamentos neuropsiquiátricos do tipo SZ que estes animais apresentam (Figura 56).

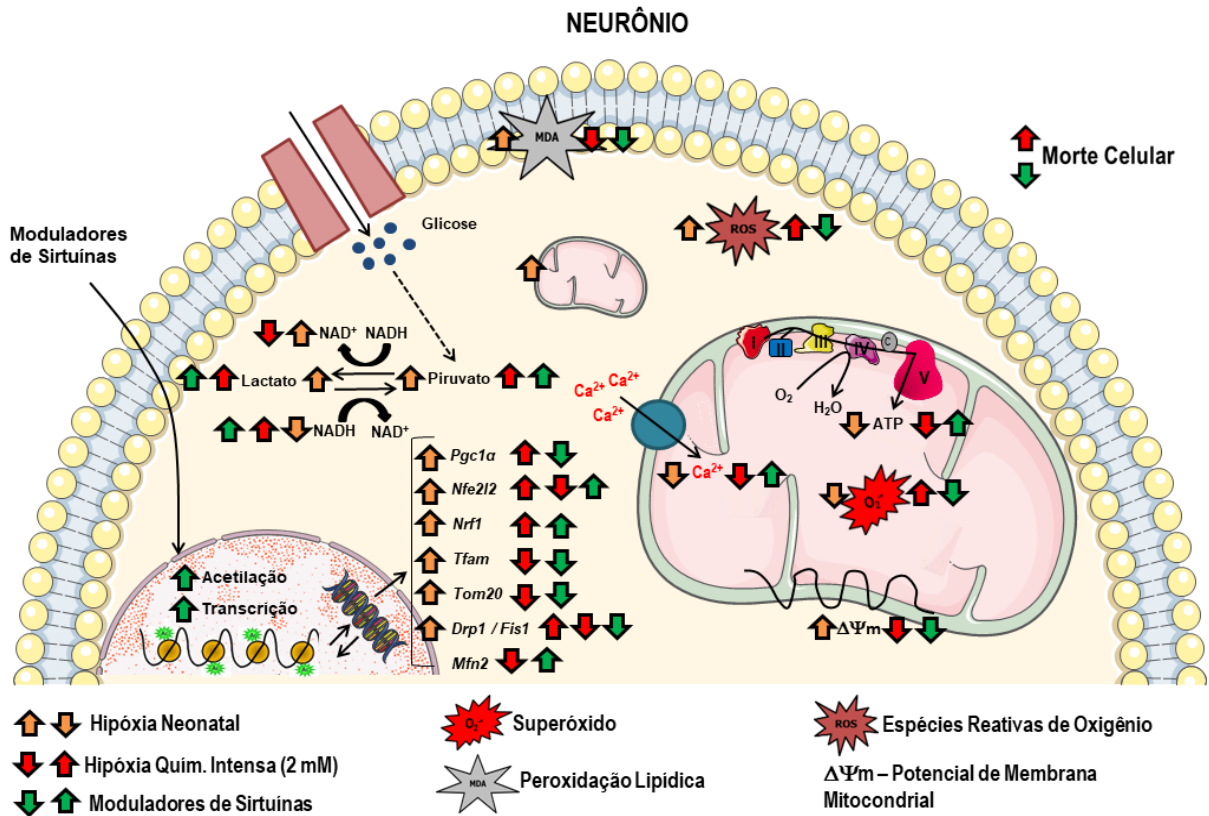
Esses dados são reforçados quando analisamos os neurônios controle submetidos à hipóxia química. Nesse sentido, quando as células que não passaram por hipóxia, encontram-se no estado de hipóxia, seu perfil metabólico e as proteínas



da função neural, são semelhantes ao grupo hipóxia neonatal (SHR), demonstrando que a hipóxia realmente desempenha um papel em ambos os cenários. Além disso, quando submetemos os neurônios SHR (hipóxia neonatal) à hipóxia química, alguns dos mecanismos que sugerimos ser de compensação metabólica, são desregulados, diminuindo a viabilidade celular. Em contrapartida, o tratamento prévio com moduladores de SIRT6 promove a acetilação de H3K9, o que diminui o estresse oxidativo e aumenta a massa mitocondrial aumentando a viabilidade de ambos os neurônios (Wistar e SHR). Em relação à função neural, o NAM parece regular a formação e liberação de vesículas, bem como ampliar a transmissão sináptica em neurônios Wistar e reduzir nos SHR. Ainda, parece haver uma diminuição da poda neural.

Ao todo, a acetilação dessa região (H3K9ac) pode ser um alvo terapêutico interessante para neutralizar os danos ocasionados por uma situação de hipóxia, ou redução de oxigênio em neurônios. Pelo fato de que a hipóxia pré-natal é um fator ambiental relacionado a distúrbios neuropsiquiátricos, como a SZ, o tratamento com os moduladores de SIRT6 pode também ser considerado uma estratégia terapêutica, auxiliando na defesa contra possíveis disfunções mitocondriais (Nalivaeva et al., 2018; Jones e Thornton, 2022; E Silva et al., 2019; Calió et al., 2020; Liu et al., 2022).

**FIGURA 56:** Imagem resumo dos resultados encontrados na cultura primária de neurônios de animais controle (Wistar) e SHR submetidos a hipóxia química e tratadas previamente com os moduladores de SIRT6



**Legenda:** Setas laranjas indicam as alterações provocadas pela hipóxia neonatal observadas em neurônios primários do córtex de animais SHR. Setas vermelhas demonstram as alterações provocadas pelas condições de hipóxia química intensa (CoCl<sub>2</sub> 2 mM) em neurônios Wistar e SHR. As setas verdes indicam as alterações provocadas pelo tratamento prévio com os moduladores de SIRT6 (NAM 50 μM Rsv 0.5 μM e Sir 5 μM) e posterior exposição a hipóxia química intensa (CoCl<sub>2</sub> 2 mM) em neurônios Wistar e SHR.

ADAPTAÇÃO DA FONTE: Araújo et al., 2021

## REFERÊNCIAS

- Abílio, VC, Calzavara, M. B., Silva, R. H. et al. Modelos Animais em Psicofarmacologia. In: Eduardo Pondé de Sena; Ângela M.A. Miranda-Scippa; Lucas de Castro Quarantini; Irismar Reis de Oliveira. (Org.). Psicofarmacologia Clínica. 3aed.: Medbook, 2011, v. , p. 29-48.
- Adamkova K, Yi Y-J, Petr J, Zalmanova T, Hoskova K, Jelinkova P, et al. SIRT1-dependent modulation of methylation and acetylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9) in the zygotic pronuclei improves porcine embryo development. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2017 Nov 1;8(1).
- Agostini M, Romeo F, Inoue S, Niklison-Chirou MV, Elia AJ, Dinsdale D, et al. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death & Differentiation*. 2016 Apr 8;23(9):1502–14.
- Akbarian S, Ruehl MG, Bliven E, Luiz LA, Peranelli AC, Baker SP, et al. Chromatin Alterations Associated With Down-regulated Metabolic Gene Expression in the Prefrontal Cortex of Subjects With Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*. 2005 Aug 1;62(8):829.
- Akyuva Y, Nazıroğlu M. Resveratrol attenuates hypoxia-induced neuronal cell death, inflammation and mitochondrial oxidative stress by modulation of TRPM2 channel. *Scientific Reports*. 2020 Apr 15;10(1).
- Angelova PR, Kasymov V, Christie I, Sheikhabaei S, Turovsky E, Marina N, et al. Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. *Journal of Neuroscience* [Internet]. 2015 Jul 22 [cited 2020 Oct 29];35(29):10460–73.
- Arteaga O, Revuelta M, Urigüen L, Álvarez A, Montalvo H, Hilario E. Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats. Mongin AA, editor. *PLOS ONE*. 2015 Nov 6;10(11):e0142424.
- Atladóttir HO, Henriksen TB, Schendel DE, Parner ET. Autism After Infection, Febrile Episodes, and Antibiotic Use During Pregnancy: An Exploratory Study. *PEDIATRICS* [Internet]. 2012 Nov 12 [cited 2019 Sep 8];130(6):e1447–54.
- Atladóttir HÓ, Thorsen P, Schendel DE, Østergaard L, Lemcke S, Parner ET. Association of Hospitalization for Infection in Childhood With Diagnosis of Autism Spectrum Disorders. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 2010 May 1;164(5).
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [Internet]. 2014;2014:1–31.
- Baburamani A, Hurling C, Stolp H, Sobotka K, Gressens P, Hagberg H, et al. Mitochondrial Optic Atrophy (OPA) 1 Processing Is Altered in Response to Neonatal

Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015 Sep 17;16(9):22509–26.

Balaiya, S, Khetpal, V, e Chalam, KV. Hypoxia initiates sirtuin1-mediated vascular endothelial growth factor activation in choroidal endothelial cells through hypoxia inducible factor-2 $\alpha$ . *Molecular vision*, 2012; 18, 114–120.

Bale TL, Baram TZ, Brown AS, Goldstein JM, Insel TR, McCarthy MM, et al. Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry*. 2010 Aug;68(4):314–9.

Bao MH-R, Wong CC-L. Hypoxia, Metabolic Reprogramming, and Drug Resistance in Liver Cancer. *Cells*. 2021 Jul 6;10(7):1715.

Barateiro A, Brites D, Fernandes A. Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Current Pharmaceutical Design [Internet]*. 2016 [cited 2022 Jan 30];22(6):656–79.

Bassan H, Bassan M, Pinhasov A, Kariv N, Giladi E, Gozes I, et al. The Pregnant Spontaneously Hypertensive Rat as a Model of Asymmetric Intrauterine Growth Retardation and Neurodevelopmental Delay. *Hypertension in Pregnancy*. 2005 Jan;24(3):201–11.

Batie M, del Peso L, Rocha S. Hypoxia and Chromatin: A Focus on Transcriptional Repression Mechanisms. *Biomedicines*. 2018 Apr 22;6(2):47.

Batie M, del Peso L, Rocha S. Hypoxia and Chromatin: A Focus on Transcriptional Repression Mechanisms. *Biomedicines*. 2018 Apr 22;6(2):47.

Batie M, Frost J, Frost M, Wilson JW, Schofield P, Rocha S. Hypoxia induces rapid changes to histone methylation and reprograms chromatin. *Science [Internet]*. 2019 Mar 15 [cited 2021 Feb 1];363(6432):1222–6.

Batie M, Rocha S. Gene transcription and chromatin regulation in hypoxia. *Biochemical Society Transactions*. 2020 May 5;48(3):1121–8.

Bender T, Martinou J-C. The mitochondrial pyruvate carrier in health and disease: To carry or not to carry? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2016 Oct;1863(10):2436–42.

Ben-Shachar D, Karry R. Neuroanatomical Pattern of Mitochondrial Complex I Pathology Varies between Schizophrenia, Bipolar Disorder and Major Depression. Hashimoto K, editor. *PLoS ONE [Internet]*. 2008 Nov 7 [cited 2019 Dec 30];3(11):e3676.

Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Reshef A, Sheinkman A, Klein E. Increased mitochondrial complex I activity in platelets of schizophrenic patients. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 1999 Dec;2(4):245–53.

- Ben-Shachar D. The bimodal mechanism of interaction between dopamine and mitochondria as reflected in Parkinson's disease and in schizophrenia. *Journal of Neural Transmission*. 2019 Dec 17;127(2):159–68.
- Berchner-Pfannschmidt U, Petrat F, Doege K, Trinidad B, Freitag P, Metzen E, et al. Chelation of Cellular Calcium Modulates Hypoxia-inducible Gene Expression through Activation of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Aug 18;279(43):44976–86.
- Berna, N, Arnould, T, Remacle, J, et al. Hypoxia-induced increase in intracellular calcium concentration in endothelial cells: role of the Na(+)-glucose cotransporter. *Journal of cellular biochemistry*, 2001; 84(1), 115–131.
- Blesa JR, Prieto-Ruiz JA, Hernández JM, Hernández-Yago J. NRF-2 transcription factor is required for human TOMM20 gene expression. *Gene*. 2007 Apr;391(1-2):198–208.
- Bonkowsky JL, Son J-H. Hypoxia and connectivity in the developing vertebrate nervous system. *Disease Models & Mechanisms*. 2018 Dec 1;11(12).
- Bonnaud EM, Suberbielle E, Malnou CE. Histone acetylation in neuronal (dys)function. *Biomolecular Concepts*. 2016 May 1;7(2):103–16.
- Bošković M, Grabnar I, Terzič T, Kores Plesničar B, Vovk T. Oxidative stress in schizophrenia patients treated with long-acting haloperidol decanoate. *Psychiatry Research*. 2013 Dec;210(3):761–8.
- Bouchez C, Devin A. Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP/PKA Signaling Pathway. *Cells*. 2019 Mar 27;8(4):287.
- Boulter N, Suarez FG, Schibeci S, Sunderland T, Tolhurst O, Hunter T, et al. A simple, accurate and universal method for quantification of PCR. *BMC Biotechnology*. 2016 Mar 9;16(1).
- Bradshaw PC. Acetyl-CoA Metabolism and Histone Acetylation in the Regulation of Aging and Lifespan. *Antioxidants*. 2021 Apr 8;10(4):572.
- Braidy N, Guillemin GJ, Grant R. Effects of Kynurenine Pathway Inhibition on NAD<sup>+</sup> Metabolism and Cell Viability in Human Primary Astrocytes and Neurons. *International Journal of Tryptophan Research*. 2011 Jan;4:IJTR.S7052.
- Brandon A, Cui X, Luan W, Ali AA, Pertile RAN, Alexander SA, et al. Prenatal hypoxia alters the early ontogeny of dopamine neurons. *Translational Psychiatry*. 2022 Jun 7;12(1).
- Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Mar;284(13):8797–811.

- Bulut M, Selek S, Bez Y, Cemal Kaya M, Gunes M, Karababa F, et al. Lipid peroxidation markers in adult attention deficit hyperactivity disorder: New findings for oxidative stress. *Psychiatry Research*. 2013 Oct;209(3):638–42.
- Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006 Mar;27(3):166–76.
- Calió ML, Henriques E, Siena A, Bertoncini CRA, Gil-Mohapel J, Rosenstock TR. Mitochondrial Dysfunction, Neurogenesis, and Epigenetics: Putative Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Neurodegeneration and Treatment. *Frontiers in Neuroscience*. 2020 Jul 15;14.
- Calvert JW, Elston M, Nicholson CK, Gundewar S, Jha S, Elrod JW, et al. Genetic and Pharmacologic Hydrogen Sulfide Therapy Attenuates Ischemia-Induced Heart Failure in Mice. *Circulation*. 2010 Jul 6;122(1):11–9.
- Calzavara MB, Levin R, Medrano WA, Almeida V, Sampaio APF, Barone LC, et al. Effects of antipsychotics and amphetamine on social behaviors in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural Brain Research*. 2011 Nov;225(1):15–22.
- Cannon TD, van Erp TGM, Rosso IM, Huttunen M, Lönqvist J, Pirkola T, et al. Fetal Hypoxia and Structural Brain Abnormalities in Schizophrenic Patients, Their Siblings, and Controls. *Archives of General Psychiatry*. 2002 Jan 1;59(1):35.
- Cantó C, Auwerx J. PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Current Opinion in Lipidology* [Internet]. 2009 Apr [cited 2019 Sep 13];20(2):98–105.
- Caradec J, Sirab N, Keumeugni C, Moutereau S, Chimingqi M, Matar C, et al. “Desperate house genes”: the dramatic example of hypoxia. *British Journal of Cancer* [Internet]. 2010 Mar 16 [cited 2020 Dec 16];102(6):1037–43.
- Carafa V, Rotili D, Forgione M, Cuomo F, Serretiello E, Hailu GS, et al. Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. *Clinical Epigenetics*. 2016 May 25;8(1).
- Cardanho-Ramos C, Morais VA. Mitochondrial Biogenesis in Neurons: How and Where. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Apr 19];22(23):13059.
- Carvalho ACP, Sharpe J, Rosenstock TR, Teles AFV, Kowaltowski AJ, Youle RJ, et al. Bax affects intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and induces Ca<sup>2+</sup> wave propagation. *Cell Death & Differentiation*. 2004 Oct 22;11(12):1265–76.
- Chaban Y, Boekema EJ, Dudkina NV. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2014 Apr;1837(4):418–26.
- Chan SHH, Tai M-H, Li C-Y, Chan JYH. Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and

neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006 Jun;40(11):2028–39.

Chandramowliswaran P, Vijay A, Abraham D, Li G, Mwangi SM, Srinivasan S. Role of Sirtuins in Modulating Neurodegeneration of the Enteric Nervous System and Central Nervous System. *Frontiers in Neuroscience*. 2020 Dec 22;14.

Chang C-K, Hayes RD, Perera G, Broadbent MTM, Fernandes AC, Lee WE, et al. Life Expectancy at Birth for People with Serious Mental Illness and Other Major Disorders from a Secondary Mental Health Care Case Register in London. Scott JG, editor. *PLoS ONE*. 2011 May 18;6(5):e19590.

Chen R, Lai UH, Zhu L, Singh A, Ahmed M, Forsyth NR. Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2018 Oct 10;6.

Chen W-F, Chang H, Huang L-T, Lai M-C, Yang C-H, Wan T-H, et al. Alterations in long-term seizure susceptibility and the complex of PSD-95 with NMDA receptor from animals previously exposed to perinatal hypoxia. *Epilepsia* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2022 Feb 17];47(2):288–96.

Cheng D, Wu R, Guo Y, Kong A-NT. Regulation of Keap1–Nrf2 signaling: The role of epigenetics. *Current Opinion in Toxicology*. 2016 Dec;1:134–8.

Chestkov IV, Jestkova EM, Ershova ES, Golimbet VG, Lezheiko TV, Kolesina NY, et al. ROS-Induced DNA Damage Associates with Abundance of Mitochondrial DNA in White Blood Cells of the Untreated Schizophrenic Patients. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018:1–7.

Choi J, Chandrasekaran K, Inoue T, Muragundla A, Russell JW. PGC-1 $\alpha$  regulation of mitochondrial degeneration in experimental diabetic neuropathy. *Neurobiology of Disease* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2020 Nov 25];64:118–30.

Clouston, TS (1891). *The neuroses of development: being the Morison lectures for 1890*. Edinburgh: Oliver and Boyd; p. viii, 138.

Colton CW, Manderscheid RW. Congruencies in increased mortality rates, years of potential life lost, and causes of death among public mental health clients in eight states. *Preventing Chronic Disease* [Internet]. 2006 Apr 1;3(2):A42.

Corona JC, Duchon MR. PPAR $\gamma$  as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016 Nov;100:153–63.

Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death. *Biochimie*. 2002 Feb;84(2-3):143–52.

Currais A, Huang L, Goldberg J, Petrascheck M, Ates G, Pinto-Duarte A, et al. Elevating acetyl-CoA levels reduces aspects of brain aging. *eLife*. 2019 Nov 19;8.

Curristin SM, Cao A, Stewart WB, Zhang H, Madri JA, Morrow JS, et al. Disrupted synaptic development in the hypoxic newborn brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Nov 15;99(24):15729–34.

da Silva Siqueira L, Majolo F, da Silva APB, da Costa JC, Marinowic DR. Neurospheres: a potential in vitro model for the study of central nervous system disorders. *Molecular Biology Reports*. 2021 Mar 25;48(4):3649–63.

Da Silva T, Wu A, Laksono I, Prce I, Maheandiran M, Kiang M, et al. Mitochondrial function in individuals at clinical high risk for psychosis. *Scientific Reports [Internet]*. 2018 Apr 18 [cited 2021 Jan 1];8(1):6216.

Dai H, Sinclair DA, Ellis JL, Steegborn C. Sirtuin activators and inhibitors: Promises, achievements, and challenges. *Pharmacology & Therapeutics [Internet]*. 2018 Aug 1 [cited 2020 Dec 6];188:140–54.

Dalman C, Allebeck P, Cullberg J, Grunewald C, Köster M. Obstetric Complications and the Risk of Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*. 1999 Mar 1;56(3):234.

Davis J, Eyre H, Jacka FN, Dodd S, Dean O, McEwen S, et al. A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews [Internet]*. 2016 Jun;65:185–94.

De Backer J, Maric D, Bosman M, Dewilde S, Hoogewijs D. A reliable set of reference genes to normalize oxygen-dependent cytoglobin gene expression levels in melanoma. *Scientific Reports [Internet]*. 2021 May 25 [cited 2022 Jul 18];11(1).

de Oliveira L, Fraga DB, De Luca RD, Canever L, Ghedim FV, Matos MPP, et al. Behavioral changes and mitochondrial dysfunction in a rat model of schizophrenia induced by ketamine. *Metabolic Brain Disease*. 2011 Feb 18;26(1):69–77.

Dejos C, Gkika D, Cantelmo AR. The Two-Way Relationship Between Calcium and Metabolism in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020 Nov 13;8.

Devine MJ, Kittler JT. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience [Internet]*. 2018 Feb;19(2):63–80.

Devine MJ, Norkett R, Kittler JT. DISC1 is a coordinator of intracellular trafficking to shape neuronal development and connectivity. *The Journal of Physiology*. 2016 Jun 12;594(19):5459–69.

Dietrich-Muszalska A, Kolodziejczyk-Czepas J, Nowak P. Comparative Study of the Effects of Atypical Antipsychotic Drugs on Plasma and Urine Biomarkers of Oxidative Stress in Schizophrenic Patients. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2021 Feb;Volume 17:555–65.

Dietrich-Muszalska A, Kontek B. Lipid peroxidation in patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2010 Sep 28;64(5):469–75.



Dietrich-Muszalska A, Malinowska J, Olas B, Głowacki R, Bald E, Wachowicz B, et al. The Oxidative Stress May be Induced by the Elevated Homocysteine in Schizophrenic Patients. *Neurochemical Research* [Internet]. 2012 Jan 24 [cited 2021 May 5];37(5):1057–62.

Dietrich-Muszalska A, Olas B, Głowacki R, Bald E. Oxidative/Nitrative Modifications of Plasma Proteins and Thiols from Patients with Schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2009;59(1):1–7.

Dietrich-Muszalska A, Wachowicz B. Platelet haemostatic function in psychiatric disorders: Effects of antidepressants and antipsychotic drugs. *The World Journal of Biological Psychiatry*. 2016 Apr 26;18(8):564–74.

Du J, Yi M, Zhou F, He W, Yang A, Qiu M, et al. S100B is selectively expressed by gray matter protoplasmic astrocytes and myelinating oligodendrocytes in the developing CNS. *Molecular Brain*. 2021 Oct 6;14(1).

Duarte JMN, Xin L. Magnetic Resonance Spectroscopy in Schizophrenia: Evidence for Glutamatergic Dysfunction and Impaired Energy Metabolism. *Neurochemical Research*. 2018 Apr 3;44(1):102–16.

E Silva LFS e Rosenstock TR. Sirtuínas na neuropatologia da esquizofrenia: implicação contra a disfunção mitocondrial na hipóxia. *Dissertação, Mestrado*. São Paulo, Brasil: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2018.

e Silva LFS, Brito MD, Yuzawa JMC, Rosenstock TR. Mitochondrial Dysfunction and Changes in High-Energy Compounds in Different Cellular Models Associated to Hypoxia: Implication to Schizophrenia. *Scientific Reports*. 2019 Dec;9(1).

Ekici M, Hohl M, Schuit F, Martínez-Serrano A, Thiel G. Transcription of Genes Encoding Synaptic Vesicle Proteins in Human Neural Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Apr;283(14):9257–68.

Eliyahu E, Pnueli L, Melamed D, Scherrer T, Gerber AP, Pines O, et al. Tom20 Mediates Localization of mRNAs to Mitochondria in a Translation-Dependent Manner. *Molecular and Cellular Biology*. 2009 Oct 26;30(1):284–94.

Etcheagaray J-P, Mostoslavsky R. Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. *Molecular Cell*. 2016 Jun;62(5):695–711.

Eyles DW. How do established developmental risk-factors for schizophrenia change the way the brain develops? *Translational Psychiatry*. 2021 Mar 8;11(1).

Faizi M, Salimi A, Rasoulzadeh M, Naserzadeh P, Pourahmad J. Schizophrenia induces oxidative stress and cytochrome C release in isolated rat brain mitochondria: a possible pathway for induction of apoptosis and neurodegeneration. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* [Internet]. 2014 [cited 2022 Sep 26];13(Suppl):93–100.

Föcking M, Doyle B, Munawar N, Dillon ET, Cotter D, Cagney G. Epigenetic Factors in Schizophrenia: Mechanisms and Experimental Approaches. *Complex Psychiatry* [Internet]. 2019;5(1):6–12.

Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation research* [Internet]. 2018 Mar 16;122(6):877–902.

Fritsche E, Barenys M, Klose J, Masjosthusmann S, Nimtz L, Schmuck M, et al. Development of the Concept for Stem Cell-Based Developmental Neurotoxicity Evaluation. *Toxicological Sciences*. 2018 Jun 29;165(1):14–20.

Fuhrmann DC, Brüne B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biology* [Internet]. 2017 Aug [cited 2020 Jan 21];12:208–15.

Funasaka T, Yanagawa T, Hogan V, Raz A. Regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor expression by hypoxia. *The FASEB Journal*. 2005 Sep;19(11):1422–30.

Galicia-Moreno M, Lucano-Landeros S, Monroy-Ramirez HC, Silva-Gomez J, Gutierrez-Cuevas J, Santos A, et al. Roles of Nrf2 in Liver Diseases: Molecular, Pharmacological, and Epigenetic Aspects. *Antioxidants*. 2020 Oct 13;9(10):980.

Gates LA, Shi J, Rohira AD, Feng Q, Zhu B, Bedford MT, et al. Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2017 Jul 17 [cited 2020 May 8];jbc.M117.802074.

Ge P, Dawson VL, Dawson TM. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2020 Mar 13;15(1).

George M, Maheshwari S, Chandran S, Manohar JS, Sathyanarayana Rao TS. Understanding the schizophrenia prodrome. *Indian journal of psychiatry* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 3];59(4):505–9.

Gheisari Y, Moein S, Javanmard S, Abedi M, Izadpanahi M. Identification of Appropriate Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Long-term Hypoxia-treated Kidney Cells. *Advanced Biomedical Research*. 2017;6(1):15.

Giannopoulou I, Pagida MA, Briana DD, Panayotacopoulou MT. Perinatal hypoxia as a risk factor for psychopathology later in life: the role of dopamine and neurotrophins. *Hormones*. 2018 Mar;17(1):25–32.

Gilbert TM, Zürcher NR, Wu CJ, Bhanot A, Hightower BG, Kim M, et al. PET neuroimaging reveals histone deacetylase dysregulation in schizophrenia. *The Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2019 Jan 2 [cited 2022 Feb 21];129(1):364–72.

Giralt A, Hondares E, Villena JA, Ribas F, Díaz-Delfín J, Giralt M, et al. Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$  Controls Transcription of the Sirt3 Gene, an Essential Component of the Thermogenic Brown Adipocyte Phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 May;286(19):16958–66.

Glantz LA, Gilmore JH, Hamer RM, Lieberman JA, Jarskog LF. Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood. *Neuroscience*. 2007 Nov;149(3):582–91.

Gnaiger, E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis. *Mitochondr. Physiol*. 2014; Network 19, 12.

Gräff J, Kahn M, Samiei A, Gao J, Ota KT, Rei D, et al. A Dietary Regimen of Caloric Restriction or Pharmacological Activation of SIRT1 to Delay the Onset of Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience* [Internet]. 2013 May 22 [cited 2021 May 4];33(21):8951–60.

Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dec;444(7121):868–74.

Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, Panizzutti BS, Rezin GT, Massuda R, et al. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *Journal of Psychiatric Research*. 2013 Oct;47(10):1396–402.

Gubert C, Stertz L, Pfaffenseller B, Panizzutti BS, Rezin GT, Massuda R, et al. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. *Journal of Psychiatric Research*. 2013 Oct;47(10):1396–402.

Guedes-Dias P, Oliveira JMA. Lysine deacetylases and mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2013 Aug;1832(8):1345–59.

Gureev AP, Shaforostova EA, Popov VN. Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction Between the Nrf2 and PGC-1 $\alpha$  Signaling Pathways. *Frontiers in Genetics*. 2019 May 14;10.

Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*. 2010 Sep;35(9):505–13.

Hamanaka Robert B, Weinberg Samuel E, Reczek Colleen R, Chandel Navdeep S. The Mitochondrial Respiratory Chain Is Required for Organismal Adaptation to Hypoxia. *Cell Reports*. 2016 Apr;15(3):451–9.

Harrison IF, Powell NM, Dexter DT. The histone deacetylase inhibitor nicotinamide exacerbates neurodegeneration in the lactacystin rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. 2018 Nov 26;148(1):136–56.

- Hayashi Y, Yokota A, Harada H, Huang G. Hypoxia/pseudohypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in cancer. *Cancer Science*. 2019 Mar 23;110(5):1510–7.
- Hefter D, Marti HH, Gass P, Inta D. Perinatal Hypoxia and Ischemia in Animal Models of Schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry* [Internet]. 2018 Mar 29 [cited 2021 Dec 11];9:106.
- Hernansanz-Agustín P, Izquierdo-Álvarez A, Sánchez-Gómez FJ, Ramos E, Villa-Piña T, Lamas S, et al. Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014 Jun;71:146–56.
- Hong X-Y, Hong X, Gu W-W, Lin J, Yin W-T. Cardioprotection and improvement in endothelial-dependent vasodilation during late-phase of whole body hypoxic preconditioning in spontaneously hypertensive rats via VEGF and endothelin-1. *European Journal of Pharmacology*. 2019 Jan;842:79–88.
- Howes OD, Williams M, Ibrahim K, Leung G, Egerton A, McGuire PK, et al. Midbrain dopamine function in schizophrenia and depression: a post-mortem and positron emission tomographic imaging study. *Brain* [Internet]. 2013 Oct 3;136(11):3242–51.
- Huang H, Shu N, Mishra V, Jeon T, Chalak L, Wang ZJ, et al. Development of Human Brain Structural Networks Through Infancy and Childhood. *Cerebral Cortex*. 2013 Dec 11;25(5):1389–404.
- Hwang ES, Song SB. Nicotinamide is an inhibitor of SIRT1 in vitro, but can be a stimulator in cells. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2020 Dec 6];74(18):3347–62.
- Ichikawa T, Arai M, Miyashita M, Arai M, Obata N, Nohara I, et al. Schizophrenia: Maternal inheritance and heteroplasmy of mtDNA mutations. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012 Jan;105(1):103–9.
- Insel TR. Rethinking schizophrenia. *Nature* [Internet]. 2010;468(7321):187–93.
- Jones A, Thornton C. Mitochondrial dynamics in the neonatal brain – a potential target following injury? *Bioscience Reports*. 2022 Mar;42(3).
- Kadenbach B. Introduction to mitochondrial oxidative phosphorylation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2012 [cited 2021 Apr 28];748:1–11.
- Kahn RS, Sommer IE, Murray RM, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR, Cannon TD, et al. Schizophrenia. *Nature Reviews Disease Primers* [Internet]. 2015 Nov 12;1(1)..
- Keshavan MS, Anderson S, Pettegrew JW. Is schizophrenia due to excessive synaptic pruning in the prefrontal cortex? The Feinberg hypothesis revisited. *Journal of Psychiatric Research* [Internet]. 1994 May 1 [cited 2020 Apr 16];28(3):239–65.

- Keshavan MS. Development, disease and degeneration in schizophrenia: a unitary pathophysiological model. *Journal of Psychiatric Research*. 1999 Nov;33(6):513–21.
- Kiessling V, Kreutzberger AJB, Liang B, Nyenhuis SB, Seelheim P, Castle JD, et al. A molecular mechanism for calcium-mediated synaptotagmin-triggered exocytosis. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2018 Oct;25(10):911–7.
- Kim J, Lee H, Yi S-J, Kim K. Gene regulation by histone-modifying enzymes under hypoxic conditions: a focus on histone methylation and acetylation. *Experimental & Molecular Medicine*. 2022 Jul 22;54(7):878–89.
- Kim T, Park JK, Kim H-J, Chung J-H, Kim JW. Association of histone deacetylase genes with schizophrenia in Korean population. *Psychiatry Research*. 2010 Jul;178(2):266–9.
- Kindrick JD, Mole DR. Hypoxic Regulation of Gene Transcription and Chromatin: Cause and Effect. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Nov 6;21(21):8320.
- Kiyama T, Chen C-K, Wang SW, Pan P, Ju Z, Wang J, et al. Essential roles of mitochondrial biogenesis regulator Nrf1 in retinal development and homeostasis. *Molecular Neurodegeneration*. 2018 Oct 17;13(1).
- Koos BJ. Adenosine A<sub>2</sub> receptors and O<sub>2</sub> sensing in development. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011 Sep;301(3):R601–22.
- Kowaltowski AJ, Menezes-Filho SL, Assali EA, Gonçalves IG, Cabral-Costa JV, Abreu P, et al. Mitochondrial morphology regulates organellar Ca<sup>2+</sup> uptake and changes cellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *The FASEB Journal*. 2019 Sep 5;33(12):13176–88.
- Kuhlmann K, Cieselski M, Schumann J. Relative versus absolute RNA quantification: a comparative analysis based on the example of endothelial expression of vasoactive receptors. *Biological Procedures Online*. 2021 Feb 14;23(1).
- Lackner LL. Determining the shape and cellular distribution of mitochondria: the integration of multiple activities. *Current Opinion in Cell Biology*. 2013 Aug;25(4):471–6.
- Laemmle A, Lechleiter A, Roh V, Schwarz C, Portmann S, Furer C, et al. Inhibition of SIRT1 Impairs the Accumulation and Transcriptional Activity of HIF-1 $\alpha$  Protein under Hypoxic Conditions. Blagosklonny MV, editor. *PLoS ONE*. 2012 Mar 30;7(3):e33433.
- Lahti-Pulkkinen M, Cudmore MJ, Haeussner E, Schmitz C, Pesonen A-K, Hämäläinen E, et al. Placental Morphology Is Associated with Maternal Depressive Symptoms during Pregnancy and Toddler Psychiatric Problems. *Scientific Reports*. 2018 Jan 15;8(1).

Lakshminarayanan B, Baek SC, Lee JP, Kannappan N, Mangiatordi GF, Nicolotti O, et al. Ethoxylated Head of Chalcones as a New Class of Multi-Targeted MAO Inhibitors. *ChemistrySelect*. 2019 Jun 6;4(21):6614–9.

Larson MK, Walker EF, Compton MT. Early signs, diagnosis and therapeutics of the prodromal phase of schizophrenia and related psychotic disorders. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2010 Aug;10(8):1347–59.

Laursen TM, Munk-Olsen T, Nordentoft M, Mortensen PB. Increased Mortality Among Patients Admitted With Major Psychiatric Disorders. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2007 Jun 15;68(06):899–907.

Lavie J, Serrat R, Bellance N, Courtand G, Dupuy J-W, Tesson C, et al. Mitochondrial morphology and cellular distribution are altered in SPG31 patients and are linked to DRP1 hyperphosphorylation. *Human Molecular Genetics*. 2016 Dec 22;ddw425.

Lee C. Collaborative Power of Nrf2 and PPAR $\gamma$  Activators against Metabolic and Drug-Induced Oxidative Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:1–14.

Lee P, Chandel NS, Simon MC. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020 Mar 6;21(5).

Leiser SF, Kaeberlein M. A Role for SIRT1 in the Hypoxic Response. *Molecular Cell*. 2010 Jun;38(6):779–80.

Lemeshko V. The Warburg Effect as a VDAC-Hexokinase-Mediated Electrical Suppression of Mitochondrial Energy Metabolism. *The FASEB Journal*. 2015 Apr;29(S1).

Li J, Ryan SK, Deboer E, Cook K, Fitzgerald S, Lachman HM, et al. Mitochondrial deficits in human iPSC-derived neurons from patients with 22q11.2 deletion syndrome and schizophrenia. *Translational Psychiatry*. 2019 Nov 18;9(1).

Lim J-H, Lee Y-M, Chun Y-S, Chen J, Kim J-E, Park J-W. Sirtuin 1 Modulates Cellular Responses to Hypoxia by Deacetylating Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ . *Molecular Cell*. 2010 Jun;38(6):864–78.

Lin C-J, Chen T-H, Yang L-Y, Shih C-M. Resveratrol protects astrocytes against traumatic brain injury through inhibiting apoptotic and autophagic cell death. *Cell Death & Disease*. 2014 Mar;5(3):e1147–7.

Lin-Hendel Erika G, McManus Meagan J, Wallace Douglas C, Anderson Stewart A, Golden Jeffrey A. Differential Mitochondrial Requirements for Radially and Non-radially Migrating Cortical Neurons: Implications for Mitochondrial Disorders. *Cell Reports*. 2016 Apr;15(2):229–37.

- Liu H, Le W. Epigenetic modifications of chronic hypoxia-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*. 2014 Mar 20;3(1).
- Liu M-L, Zhang X-T, Du X-Y, Fang Z, Liu Z, Xu Y, et al. Severe disturbance of glucose metabolism in peripheral blood mononuclear cells of schizophrenia patients: a targeted metabolomic study. *Journal of Translational Medicine*. 2015 Jul 14;13(1).
- Liu YJ, McIntyre RL, Janssens GE, Houtkooper RH. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2020 Mar;186:111212.
- Liu, T, Knowlton, AA. Repetitive ROS Injury Leads to Inactivation of NRF2-Induced Antioxidant Defense and Mitochondrial Dysfunction in Ischemic Heart Failure. *The FASEB Journal*, 2016;30, 958-5.
- Lloret A, Beal MF. PGC-1 $\alpha$ , Sirtuins and PARPs in Huntington's Disease and Other Neurodegenerative Conditions: NAD<sup>+</sup> to Rule Them All. *Neurochemical Research*. 2019 May 7;44(10):2423–34.
- Lu Y, Chu A, Turker MS, Glazer PM. Hypoxia-Induced Epigenetic Regulation and Silencing of the BRCA1 Promoter. *Molecular and Cellular Biology*. 2011 Aug 15;31(16):3339–50.
- Lumb AB. Hypoxia. *Nunn's Applied Respiratory Physiology*. 2017;327-334.e1.
- Luthi-Carter R, Taylor DM, Pallos J, Lambert E, Amore A, Parker A, et al. SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Apr 8;107(17):7927–32.
- Ma K, Chen G, Li W, Kepp O, Zhu Y, Chen Q. Mitophagy, Mitochondrial Homeostasis, and Cell Fate. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020 Jun 24;8.
- Ma Q, Xiong F, Zhang L. Gestational hypoxia and epigenetic programming of brain development disorders. *Drug Discovery Today*. 2014 Dec;19(12):1883–96.
- Maeyama K, Tomioka K, Nagase H, Yoshioka M, Takagi Y, Kato T, et al. Congenital Cytomegalovirus Infection in Children with Autism Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2017 Nov 28;48(5):1483–91.
- Magistretti PJ, Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018 Mar 8;19(4):235–49.
- Maher GM, O'Keeffe GW, Kearney PM, Kenny LC, Dinan TG, Mattsson M, et al. Association of Hypertensive Disorders of Pregnancy With Risk of Neurodevelopmental Disorders in Offspring. *JAMA Psychiatry*. 2018 Aug 1;75(8):809.

- Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT, et al. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- $\alpha$  activation. *Cell Metabolism*. 2005 Jun;1(6):393–9.
- Marina N, Ang R, Machhada A, Kasymov V, Karagiannis A, Hosford PS, et al. Brainstem Hypoxia Contributes to the Development of Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension [Internet]*. 2015 Apr 1 [cited 2020 Nov 11];65(4):775–83.
- Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications [Internet]*. 2020 Jan 3;11(1):1–11.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Maccarrone G, Hunyadi-Gulyás E, Eberlin MN, et al. Proteomic analysis of dorsolateral prefrontal cortex indicates the involvement of cytoskeleton, oligodendrocyte, energy metabolism and new potential markers in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*. 2009 Jul;43(11):978–86.
- Martins-de-Souza D. Proteomics as a Tool for Understanding Schizophrenia. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*. 2011 Dec 28;9(3):95–101.
- Mattace Raso G, Bianco G, Esposito E, Iacono A, Meli R, Autore G. Evaluation of Placental Protein Modifications in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Placenta*. 2008 May;29(5):429–35.
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders. *Neuron*. 2008 Dec;60(5):748–66.
- Micó JA, Rojas-Corrales MO, Gibert-Rahola J, Parellada M, Moreno D, Fraguas D, et al. Reduced antioxidant defense in early onset first-episode psychosis: a case-control study. *BMC Psychiatry*. 2011 Feb 14;11(1).
- Milash B, Gao J, Stevenson TJ, Son J-H, Dahl T, Bonkowsky JL. Temporal Dysynchrony in brain connectivity gene expression following hypoxia. *BMC Genomics*. 2016 May 4;17(1).
- Mohammed SA, Ambrosini S, Lüscher T, Paneni F, Costantino S. Epigenetic Control of Mitochondrial Function in the Vasculature. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020 Mar 4;7.
- Monk C, Spicer J, Champagne FA. Linking prenatal maternal adversity to developmental outcomes in infants: the role of epigenetic pathways. *Dev Psychopathol*. 2012 Nov;24(4):1361–76.
- Morales Pantoja IE, Hu C, Perrone-Bizzozero NI, Zheng J, Bizzozero OA. Nrf2-dysregulation correlates with reduced synthesis and low glutathione levels in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neurochemistry*. 2016 Sep 19;139(4):640–50.



Morton JS, Levasseur J, Ganguly E, Quon A, Kirschenman R, Dyck JRB, et al. Characterisation of the Selective Reduced Uteroplacental Perfusion (sRUPP) Model of Preeclampsia. *Scientific Reports*. 2019 Jul 2;9(1).

Mukandala G, Tynan R, Lanigan S, O'Connor J. The Effects of Hypoxia and Inflammation on Synaptic Signaling in the CNS. *Brain Sciences*. 2016 Feb 17;6(1):6.

Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *Journal of Applied Toxicology*. 2018 Nov 28;39(4):556–70.

Murray RM, Bhavsar V, Tripoli G, Howes O. 30 Years on: How the Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia Morphed Into the Developmental Risk Factor Model of Psychosis. *Schizophrenia Bulletin*. 2017 Sep 14;43(6):1190–6.

Nagaoka A, Kunii Y, Hino M, Izumi R, Nagashima C, Takeshima A, et al. ALDH4A1 expression levels are elevated in postmortem brains of patients with schizophrenia and are associated with genetic variants in enzymes related to proline metabolism. *Journal of Psychiatric Research*. 2020 Apr;123:119–27.

Naia L, Carmo C, Campesan S, Fão L, Cotton VE, Valero J, et al. Mitochondrial SIRT3 confers neuroprotection in Huntington's disease by regulation of oxidative challenges and mitochondrial dynamics. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021 Feb;163:163–79.

Naia L, Cunha-Oliveira T, Rodrigues J, Rosenstock TR, Oliveira A, Ribeiro M, et al. Histone Deacetylase Inhibitors Protect Against Pyruvate Dehydrogenase Dysfunction in Huntington's Disease. *The Journal of Neuroscience*. 2017b Jan 25;37(10):2776–94.

Naia L, Rego AC. Isolation and Maintenance of Striatal Neurons. *BIO-PROTOCOL*. 2018;8(8).

Naia L, Rego AC. Sirtuins: double players in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015 Oct;1852(10):2183–94.

Naia L, Rosenstock TR, Oliveira AM, Oliveira-Sousa SI, Caldeira GL, Carmo C, et al. Comparative Mitochondrial-Based Protective Effects of Resveratrol and Nicotinamide in Huntington's Disease Models. *Molecular Neurobiology*. 2017a Sep 2;54(7):5385–99.

Nalivaeva NN, Turner AJ, Zhuravin IA. Role of Prenatal Hypoxia in Brain Development, Cognitive Functions, and Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*. 2018 Nov 19;12.

Neckář J, Svatoňová A, Weissová R, Drahotka Z, Zajíčková P, Brabcová I, et al. Selective replacement of mitochondrial DNA increases the cardioprotective effect of chronic continuous hypoxia in spontaneously hypertensive rats. *Clinical Science*. 2017 Apr 19;131(9):865–81.

Nielsen RE, Uggerby AS, Jensen SOW, McGrath JJ. Increasing mortality gap for patients diagnosed with schizophrenia over the last three decades — A Danish nationwide study from 1980 to 2010. *Schizophrenia Research*. 2013 May;146(1-3):22–7.

Niigaki ST, Peres FF, Ferreira L, Libanio T, Gouvea DA, Levin R, et al. Young spontaneously hypertensive rats (SHRs) display prodromal schizophrenia-like behavioral abnormalities. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019 Mar;90:169–76.

Niu J, Cao Y, Ji Y. Resveratrol, a SIRT1 Activator, Ameliorates MK-801-Induced Cognitive and Motor Impairments in a Neonatal Rat Model of Schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*. 2020 Jul 24;11.

Niu J, Cao Y, Ji Y. Resveratrol, a SIRT1 Activator, Ameliorates MK-801-Induced Cognitive and Motor Impairments in a Neonatal Rat Model of Schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*. 2020 Jul 24;11.

Nordentoft M, Wahlbeck K, Hällgren J, Westman J, Ösby U, Alinaghizadeh H, et al. Excess Mortality, Causes of Death and Life Expectancy in 270,770 Patients with Recent Onset of Mental Disorders in Denmark, Finland and Sweden. Burne T, editor. *PLoS ONE*. 2013 Jan 25;8(1):e55176.

Obrador E, Salvador-Palmer R, López-Blanch R, Dellinger RW, Estrela JM. NAD<sup>+</sup> Precursors and Antioxidants for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomedicines*. 2021 Aug 12;9(8):1000.

Orecchia A, Scarponi C, Di Felice F, Cesarini E, Avitabile S, Mai A, et al. Sirtinol Treatment Reduces Inflammation in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. Vij N, editor. *PLoS ONE*. 2011 Sep 12;6(9):e24307.

Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A, Craddock N. Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*. 2011 Mar;198(3):173–5.

Pagida MA, Konstantinidou AE, Tsekoura E, Mangoura D, Patsouris E, Panayotacopoulou MT. Vulnerability of the Mesencephalic Dopaminergic Neurons of the Human Neonate to Prolonged Perinatal Hypoxia: An Immunohistochemical Study of Tyrosine Hydroxylase Expression in Autopsy Material. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2013 Apr;72(4):337–50.

PALAY SL. Synapses in the central nervous system. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* [Internet]. 1956 [cited 2019 Dec 18];2(4 Suppl):193–202.

Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science*. 2011 Jul 21;333(6048):1456–8.

Patel PK, Leathem LD, Currin DL, Karlsgodt KH. Adolescent Neurodevelopment and Vulnerability to Psychosis. *Biological Psychiatry*. 2021 Jan;89(2):184–93.

- Pathak D, Shields LY, Mendelsohn BA, Haddad D, Lin W, Gerencser AA, et al. The Role of Mitochondrially Derived ATP in Synaptic Vesicle Recycling♦. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2015 Sep 11 [cited 2021 Apr 23];290(37):22325–36.
- Paulding WR, Schnell PO, Bauer AL, Striet JB, Nash JA, Kuznetsova AV, et al. Regulation of gene expression for neurotransmitters during adaptation to hypoxia in oxygen-sensitive neuroendocrine cells. *Microscopy Research and Technique*. 2002 Oct 16;59(3):178–87.
- Peraçoli JC, Rudge MVC, Sartori MS, Franco RJ da S. Effects of hypertension on maternal adaptations to pregnancy: experimental study on spontaneously hypertensive rats. *Sao Paulo Medical Journal*. 2001 Mar;119(2):54–8.
- Peres FF, Eufrásio RÁ, Gouvêa DA, Diana MC, Santos CM, Swardfager W, et al. A schizophrenia-like behavioral trait in the SHR model: Applying confirmatory factor analysis as a new statistical tool. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018 Jul;85:16–22.
- Petanjek Z, Judaš M, Šimić G, Rašin MR, Uylings HBM, Rakic P, et al. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011 Jul 25;108(32):13281–6.
- Peter R. H. Synaptic density in human frontal cortex — Developmental changes and effects of aging. *Brain Research*. 1979 Mar;163(2):195–205.
- Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019 Jan 9;20(5):267–84.
- Phillips RM. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2016 Jan 25;77(3):441–57.
- Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. Heme Oxygenase-1 Regulates Cardiac Mitochondrial Biogenesis via Nrf2-Mediated Transcriptional Control of Nuclear Respiratory Factor-1. *Circulation Research*. 2008 Nov 21;103(11):1232–40.
- Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current Biology* [Internet]. 2018 Feb [cited 2019 Dec 4];28(4):R170–85.
- Pinto Y. Lessons from rat models of hypertension from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research*. 1998 Jul 1;39(1):77–88.
- Poets CF. Intermittent hypoxia and long-term neurological outcome: How are they related? *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2020 Apr;25(2):101072.
- Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang J-J, Griffin JL, et al. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain

metabolism and oxidative stress. *Molecular Psychiatry* [Internet]. 2004 Apr 20 [cited 2019 Oct 14];9(7):684–97.

Qiao Y, Wang R, Yang X, Tang K, Jing N. Dual roles of histone H3 lysine 9 acetylation in human embryonic stem cell pluripotency and neural differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2015 Jan 23 [cited 2020 Aug 9];290(4):2508–20.

Quinn PMJ, Moreira PI, Ambrósio AF, Alves CH. PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. *Acta Neuropathologica Communications*. 2020 Nov 9;8(1).

Rahman MdH, Akter R, Bhattacharya T, Abdel-Daim MM, Alkahtani S, Arafah MW, et al. Resveratrol and Neuroprotection: Impact and Its Therapeutic Potential in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2020 Dec 30;11.

Rajasekaran A, Venkatasubramanian G, Berk M, Debnath M. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Pathways, mechanisms and implications. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* [Internet]. 2015 Jan [cited 2019 Oct 14];48:10–21..

Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, et al. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2021 Aug 21];55(2):165–77.

Ren L, Chen X, Chen X, Li J, Cheng B, Xia J. Mitochondrial Dynamics: Fission and Fusion in Fate Determination of Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020 Oct 15;8.

Ritz M-F, Grond-Ginsbach C, Engelter S, Lyrer P. Gene Expression Suggests Spontaneously Hypertensive Rats May Have Altered Metabolism and Reduced Hypoxic Tolerance. *Current Neurovascular Research*. 2012 Feb 1;9(1):10–9.

Roberts RC, Barksdale KA, Roche JK, Lahti AC. Decreased synaptic and mitochondrial density in the postmortem anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2015 Oct;168(1-2):543–53.

Roberts RC. Postmortem studies on mitochondria in schizophrenia. *Schizophrenia Research*. 2017 Sep;187:17–25.

Robinson R, Lähdepuro A, Tuovinen S, Girchenko P, Rantalainen V, Heinonen K, et al. Maternal Hypertensive Pregnancy Disorders and Mental and Behavioral Disorders in the Offspring: a Review. *Current Hypertension Reports*. 2021 May;23(5)

Roosterman D, Cottrell GS. The two-cell model of glucose metabolism: a hypothesis of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 2021 Jan 5;

Rosenfeld M, Brenner-Lavie H, Ari SG-B, Kavushansky A, Ben-Shachar D. Perturbation in Mitochondrial Network Dynamics and in Complex I Dependent

Cellular Respiration in Schizophrenia. *Biological Psychiatry* [Internet]. 2011 May 15 [cited 2022 Feb 28];69(10):980–8.

Rosenstock TR and Rego A. (2012). Modified mitochondrial dynamics, turnover and function in neurodegeneration: a focus on Huntington's Disease, vol. 661, no. 2. [Online].

Rosenstock TR, Bertoncini CRA, Teles AV, Hirata H, Fernandes MJS, Smaili SS. Glutamate-induced alterations in Ca<sup>2+</sup> signaling are modulated by mitochondrial Ca<sup>2+</sup> handling capacity in brain slices of R6/1 transgenic mice. *European Journal of Neuroscience*. 2010 Jul 6;32(1):60–70.

Rosenstock TR, Carvalho ACP, Jurkiewicz A, Frussa-Filho R, Smaili SS. Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. *Journal of Neurochemistry*. 2004 Jan 16;88(5):1220–8.

Rosenstock, Tatiana. (2013). Lysine (K)-deacetylase inhibitors: the real next step to neuropsychiatric and neurodegenerative disorders?. *Biohelikon: Cell Biology*. 2:a8.

Rostrup M, Fossbakk A, Hauge A, Kleppe R, Gnaiger E, Haavik J. Oxygen dependence of tyrosine hydroxylase. *Amino Acids*. 2007 May 23;34(3):455–64.

Ryu DR, Yu MR, Kong KH, Kim H, Kwon SH, Jeon JS, et al. Sirt1-hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  interaction is a key mediator of tubulointerstitial damage in the aged kidney. *Aging Cell*. 2019 Jan 6;18(2):e12904.

Sainero-Alcolado L, Liaño-Pons J, Ruiz-Pérez MV, Arsenian-Henriksson M. Targeting mitochondrial metabolism for precision medicine in cancer. *Cell Death & Differentiation*. 2022 Jul;29(7):1304–17.

Sanderson TH, Raghunayakula S, Kumar R. Neuronal hypoxia disrupts mitochondrial fusion. *Neuroscience*. 2015 Aug;301:71–8.

Santos JH. Mitochondria signaling to the epigenome: A novel role for an old organelle. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021 Jul;170:59–69.

Schmidt-Kastner R, van Os J, Esquivel G, Steinbusch HWM, Rutten BPF. An environmental analysis of genes associated with schizophrenia: hypoxia and vascular factors as interacting elements in the neurodevelopmental model. *Molecular Psychiatry*. 2012 Jan 31;17(12):1194–205.

Schroeder FA, Gilbert TM, Feng N, Taillon BD, Volkow ND, Innis RB, et al. Expression of HDAC2 but Not HDAC1 Transcript Is Reduced in Dorsolateral Prefrontal Cortex of Patients with Schizophrenia. *ACS Chemical Neuroscience*. 2016 Dec 13;8(3):662–8.

Scorisa MJ, Chadi, G. Caracterização celular e molecular da influência do astrócito na degeneração do neurônio motor no modelo in vitro da esclerose lateral

amiotrófica utilizando camundongos transgênicos para SOD1 humana mutante. Tese, Doutorado. São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo, 2010.

Semenza GL, Jiang B-H, Leung SW, Passantino R, Concordet J-P, Maire P, et al. Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 1996 Dec 20;271(51):32529–37

Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1994 Sep 23 [cited 2022 Sep 21];269(38):23757–63.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [Internet]. 2011 Jul [cited 2020 Jan 6];1813(7):1263–8.

Semenza GL. Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2014 Jan 24;9(1):47–71.

Senapati P, Kato H, Lee M, Leung A, Thai C, Sanchez A, et al. Hyperinsulinemia promotes aberrant histone acetylation in triple-negative breast cancer. *Epigenetics & Chromatin*. 2019 Jul 17;12(1).

Sharp FR, Bernaudin M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004 Jun;5(6):437–48.

Siena A, Yuzawa JMC, Ramos AC, Henrique E, Brito MD, Calvazara MB, et al. Neonatal Rotenone Administration Induces Psychiatric Disorder-Like Behavior and Changes in Mitochondrial Biogenesis and Synaptic Proteins in Adulthood. *Molecular Neurobiology*. 2021 Feb 19.

Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* [Internet]. 2018 Mar 10 [cited 2020 Dec 15];28(8):643–61.

Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* [Internet]. 2018 Mar 10;28(8):643–61.

Smaili S, Hirata H, Ureshino R, Monteforte PT, Morales AP, Muler ML, et al. Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2009 Sep;81(3):467–75.

Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [Internet]. 2010 Jun [cited 2020 Jan 21];1797(6-7):1171–7.

Son G, Han J. Roles of mitochondria in neuronal development. *BMB Reports* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2020 Oct 24];51(11):549–56.

Song SB, Park JS, Jang SY, Hwang ES. Nicotinamide Treatment Facilitates Mitochondrial Fission through Drp1 Activation Mediated by SIRT1-Induced Changes in Cellular Levels of cAMP and Ca<sup>2+</sup>. *Cells*. 2021 Mar 10;10(3):612.

Song, SB., Jang, SY., Kang, HT., et al. Modulation of Mitochondrial Membrane Potential and ROS Generation by Nicotinamide in a Manner Independent of SIRT1 and Mitophagy. *Molecules and cells*, 2017 40(7), 503–514.

Stępnicki P, Kondej M, Kaczor AA. Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. *Molecules* [Internet]. 2018 Aug 20;23(8):2087.

Stevenson TJ, Trinh T, Kogelschatz C, Fujimoto E, Lush ME, Piotrowski T, et al. Hypoxia Disruption of Vertebrate CNS Pathfinding through EphrinB2 Is Rescued by Magnesium. Penn A, editor. *PLoS Genetics*. 2012 Apr 12;8(4):e1002638.

Sudhof TC. Calcium Control of Neurotransmitter Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [Internet]. 2011 Nov 8;4(1):a011353–3.

Suvisaari J, Partti K, Perälä J, Viertiö S, Saarni SE, Lönnqvist J, et al. Mortality and Its Determinants in People With Psychotic Disorder. *Psychosomatic Medicine*. 2013 Jan;75(1):60–7.

Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays In Biochemistry* [Internet]. 2018 Jul 20 [cited 2019 May 6];62(3):341–60.

Tinkov AA, Nguyen TT, Santamaria A, Bowman AB, Buha Djordjevic A, Paoliello MMB, et al. Sirtuins as molecular targets, mediators, and protective agents in metal-induced toxicity. *Archives of Toxicology*. 2021 May 24;95(7):2263–78.

Tong W, Giussani DA. Preeclampsia link to gestational hypoxia. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2019 Apr 10;10(3):322–33.

Tsai Y-P, Wu K-J. Epigenetic regulation of hypoxia-responsive gene expression: Focusing on chromatin and DNA modifications. *International Journal of Cancer*. 2013 Jul 10;134(2):249–56.

Vayssière J-L, Cordeau-Lossouarn L, Larcher JC, Basseville M, Gros F, Croizat B. Participation of the mitochondrial genome in the differentiation of neuroblastoma cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 1992 Nov;28(11-12):763–72.

Verge B, Alonso Y, Valero J, Miralles C, Vilella E, Martorell L. Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2022 Mar 23];26(1):45–56.

Vos M. Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2010;2.

- Walker TL, Kempermann G. One Mouse, Two Cultures: Isolation and Culture of Adult Neural Stem Cells from the Two Neurogenic Zones of Individual Mice. *Journal of Visualized Experiments* [Internet]. 2014 Feb 25;(84).
- Wang B, Zeng H, Liu J, Sun M. Effects of Prenatal Hypoxia on Nervous System Development and Related Diseases. *Frontiers in Neuroscience* [Internet]. 2021 Oct 25 [cited 2022 Feb 24];15:755554.
- Wang R, Liu L, Liu H, Wu K, An J, Wang Q, et al. Nrf2 protects against diabetic dysfunction of endothelial progenitor cells via regulating cell senescence. *International Journal of Molecular Medicine*. 2018 Jun 11.
- Weaver ICG, Korgan AC, Lee K, Wheeler RV, Hundert AS, Goguen D. Stress and the Emerging Roles of Chromatin Remodeling in Signal Integration and Stable Transmission of Reversible Phenotypes. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2017 Mar 15;11.
- Weinberger DR. Future of Days Past: Neurodevelopment and Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 2017 Oct 11;43(6):1164–8.
- Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski Eduardo R, et al. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 $\alpha$  in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metabolism*. 2006 Nov;4(5):349–62.
- Wiemerslage L, Lee D. Quantification of mitochondrial morphology in neurites of dopaminergic neurons using multiple parameters. *Journal of Neuroscience Methods*. 2016 Mar;262:56–65.
- Wilde L, Roche M, Domingo-Vidal M, Tanson K, Philp N, Curry J, et al. Metabolic coupling and the Reverse Warburg Effect in cancer: Implications for novel biomarker and anticancer agent development. *Seminars in Oncology* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2020 Feb 28];44(3):198–203.
- Wilkinson MB, Xiao G, Kumar A, LaPlant Q, Renthal W, Sikder D, et al. Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. *J Neurosci*. 2009 Jun;29(24):7820–32.
- Williamson JM, Lyons DA. Myelin Dynamics Throughout Life: An Ever-Changing Landscape? *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018 Nov 19;12.
- Xin D, Li T, Chu X, Ke H, Liu D, Wang Z. MSCs-extracellular vesicles attenuated neuroinflammation, synapse damage and microglial phagocytosis after hypoxia-ischemia injury by preventing osteopontin expression. *Pharmacological Research*. 2021 Feb;164:105322.
- Xing L, Son J-H ., Stevenson TJ, Lillesaar C, Bally-Cuif L, Dahl T, et al. A Serotonin Circuit Acts as an Environmental Sensor to Mediate Midline Axon Crossing through EphrinB2. *Journal of Neuroscience*. 2015 Nov 4;35(44):14794–808.



- Xu F, Liu P, Pascual JM, Xiao G, Lu H. Effect of Hypoxia and Hyperoxia on Cerebral Blood Flow, Blood Oxygenation, and Oxidative Metabolism. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012 Jun 27;32(10):1909–18.
- Xylaki M, Atzler B, Outeiro TF. Epigenetics of the Synapse in Neurodegeneration. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2019 Aug 23;19(10).
- Yan W, Fan J, Zhang X, Song H, Wan R, Wang W, et al. Decreased neuronal synaptosome associated protein 29 contributes to poststroke cognitive impairment by disrupting presynaptic maintenance. *Theranostics*. 2021;11(10):4616–36.
- Youle RJ, van der Blik AM. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science*. 2012 Aug 30;337(6098):1062–5.
- Yu J, Wu Y, Yang P. High glucose-induced oxidative stress represses sirtuin deacetylase expression and increases histone acetylation leading to neural tube defects. *Journal of Neurochemistry*. 2016 Mar 17;137(3):371–83.
- Zehnder T, Petrelli F, Romanos J, De Oliveira Figueiredo EC, Lewis TL, Déglon N, et al. Mitochondrial biogenesis in developing astrocytes regulates astrocyte maturation and synapse formation. *Cell Reports*. 2021 Apr;35(2):108952.
- Zhang XY, Tan YL, Cao LY, Wu GY, Xu Q, Shen Y, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophrenia Research*. 2006 Jan;81(2-3):291–300.
- Zheng Y, Dong L, Liu N, Luo X, He Z. Mir-141-3p Regulates Apoptosis and Mitochondrial Membrane Potential via Targeting Sirtuin1 in a 1-Methyl-4-Phenylpyridinium in vitro Model of Parkinson's Disease. Demarin V, editor. *BioMed Research International*. 2020 Nov 6;2020:1–14.

## **ANEXO A: Neuroesferas**

Como o desenvolvimento do sistema nervoso central, bem como a própria estrutura neuronal, formação e manutenção de sinapses, são dependentes de um bom aporte energético e, portanto, dependem da plena função mitocondrial, é de suma importância verificar o papel da hipóxia sobre a neurogênese. Tal feito começou a ser realizado por meio de uma cultura de neuroesferas. As neuroesferas são um sistema em cultura de aglomerados de células-tronco neuronais flutuantes, compostas de progenitores neurais, astrocitários e oligodendrocitários, em conjunto com um pequeno número de células tronco- multipotentes (Da Silva et al., 2021).

O cultivo *in vitro* de neuroesferas permite a obtenção de uma população heterogênea de células progenitoras neurais em vários estágios ao longo do tempo de desenvolvimento. As neuroesferas se proliferam de acordo com a apresentação de um fator específico, ou seja, são capazes de se diferenciar em neurônios ou células gliais de acordo com o estímulo, como exemplo, na presença ou não de fator de crescimento epidermal (Walker e Kappermann, 2014). Nesse sentido, pretendíamos avaliar o efeito do estímulo da hipóxia sobre os parâmetros de proliferação, migração e diferenciação neural, em um conjunto celular que pode representar, efetivamente, as diferentes etapas da neurogênese no neurodesenvolvimento.

No entanto, devido a pandemia do SARs-CoV-2, não conseguimos finalizar todos os experimentos com esse modelo celular. Entretanto, conseguimos padronizar a cultura de neuroesferas de animais neonatos Wistar e SHR. Para tal, extraímos o tecido da zona subventricular (SVZ), uma região de nicho neurogênico bem embasada (Walker e Kappermann, 2014) e utilizamos um protocolo proposto por Walker e Kappermann em 2014. Nesse sentido, os neonatos foram eutanasiados com uma tesoura grande, o cérebro foi extraído e alocado em uma placa de petri contendo meio HBSS. Então foi realizado um corte coronal (2 mm), anterior ao quiasma óptico, expondo os ventrículos laterais. Em seguida, o tecido foi dissecado bilateralmente às paredes dos ventrículos da SVZ e transferido para um tubo cônico de 15 ml contendo 5 ml de meio HBSS, sobre o gelo. Após o processo, espera-se o tecido decantar e retirar-se o sobrenadante com cuidado, em seguida, foi adicionado 1 ml de tripsina 0.5% e o tecido incubado por 30 minutos a 37 °C. Logo após o tempo de incubação, a tripsina foi removida e foi adicionado 2 ml de meio HBSS para diluir o residual de tripsina e, na sequência, esperou-se o tecido

decantar novamente. Após, foi retirado o meio HBSS e adicionado outra vez 2 ml de HBSS (segunda etapa de limpeza), novamente, aguardou-se um período para que o tecido decanta-se. Em seguida, o HBSS foi removido e *pellet* ressuspensionado (*up and down*, por 40x) em meio de proliferação contendo; DMEMF12 (1x), glutamina (1%), penstrep (penicilina 100 ug/ml e estreptomicina - 1%), B27 (2%), EGF (fator de crescimento epidérmico - 20 ng/ml), FGF (Fator de crescimento de fibroblastos – 20 ng/ml) e heparina (5 µg/ml). As células foram cultivadas em frascos T25 cm<sup>2</sup> em pé, onde foram mantidas a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C por 5 dias.

Após 5 dias há a formação de neuroesferas e pode-se prosseguir para o subcultivo (ou passagem). Nessa etapa é recolhido todo conteúdo do frasco e adicionado num tubo cônico de 15 ml e centrifugado a 300 G por 5 minutos a 37 °C. Após a centrifugação, o *pellet* foi exposto a 1 ml tripsina-EDTA 0.25 % por 3 minutos a temperatura ambiente, depois foi adicionado 1 ml de inibidor de tripsina *soybean* na concentração de 0.125 mg/ml e o conteúdo centrifugado novamente a 300 G por 5 minutos a 37 °C. Na sequência o sobrenadante foi removido e foi adicionado 2 ml de meio HBSS (37 °C) para limpeza e o conteúdo foi centrifugado novamente a 300 G por 5 minutos (esse processo foi repetido por 2x). Após a última centrifugação o *pellet* foi ressuspensionado em 5 ml de meio de proliferação (*up and down*, 40x) e realizou-se a contagem com uma câmara de Neubauer. Para os experimentos de caracterização foram utilizadas 10<sup>4</sup> células por lamínula. Para os experimentos de viabilidade foram utilizadas 5 x 10<sup>3</sup> células por poço da MW6. No caso das lamínulas, houve um revestimento prévio com poli-L-Lisina (Poli-L) 1 mg/ml, conforme mencionamos na seção metodologias. No caso das MW, não necessitou de revestimento.

Após a passagem, esperou-se um período de 48 horas para que houvesse a formação dos esferóides e que começasse a aderir ao substrato. Após o tempo, decidimos realizar a exposição apenas a hipóxia química moderada (800 µM) por 24 horas e o tratamento apenas com um de nossos moduladores, a Nicotinamida (NAM 50 µM) por 48 horas. Nesse caso, foi realizado o tratamento com NAM e, após 24 horas, foi realizado o tratamento com CoCl<sub>2</sub> (800 µM), totalizando 48 horas. Vale mencionar que houve condições sem tratamento (*Untreated*), exposto somente a hipóxia química, tratadas apenas com NAM e tratadas previamente com NAM e expostas a hipóxia química. Em todos os casos, foram apenas analisadas neuroesferas Wistar (representação).

Para os testes de caracterização, as neuroesferas foram cultivadas em lamínulas e, após a aderência, foi realizado a técnica de imunofluorescência (metodologia ver seção 2.5.1), onde os esferóides foram incubados com o anticorpo Nestina (MAB353 RAT-401) (1:500) que marca células precursoras neurais, *overnight* e DAPI (1:10.000) por 10 minutos. Posteriormente, realizou-se a incubação com o anticorpo secundário *alexafuor* 488 (1:750) contra o respectivo animal em que o primário havia sido feito. Então, as lamínulas foram fotografadas utilizando o microscópio de fluorescência *Nikon digital câmera DXM 1200c*. Foram fotografadas 4 lamínulas, sendo 4 fotos por lamínula (N = 4, em duplicatas) e a análise foi feita contando as células marcadas com DAPI, normalizadas pelas células marcadas com Nestina, caso houvesse marcação sobrepostas poderíamos afirmar que nossas culturas eram de neuroesferas. Ainda, utilizando o microscópio *ZOE Fluorescent Cell Imager* (Biorad), foi fotografado, como representação, os esferóides nas MW96 e MW6, bem como as células aderidas e diferenciadas em neurônios precursores.

Para o teste de viabilidade, após o tratamento, analisamos a fluorescência total de fotos *in vivo* dos esferóides nas condições supracitadas expostos a hoescht 3342 (1 µg/ml por 3 minutos) para marcação nuclear e iodeto de propídeo (5 µg/ml por 5 minutos) para marcar células apoptóticas. As fotos foram obtidas com as neuroesferas cultivadas na MW6, com o microscópio de fluorescência *ZOE Fluorescent Cell Imager* (Biorad). Para cada condição supracitada havia 4 poços e para cada poço foram retiradas 2 fotos (N = 2). Foi analisada a fluorescência total do PI em relação à fluorescência total do Hoescht em 100%.

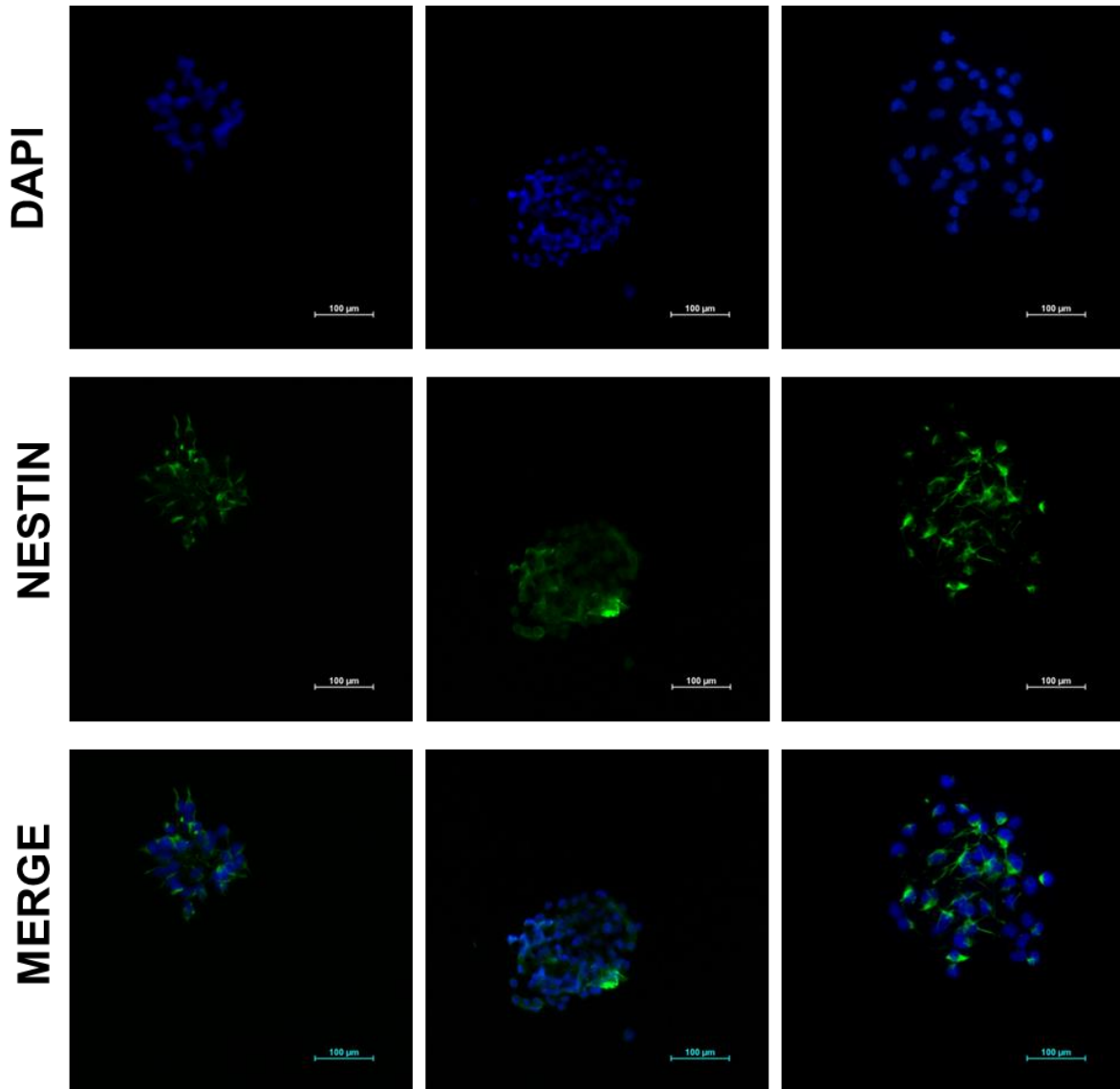
Em relação a caracterização, vemos que dos esferóides selecionados para a representação, 100% deles estavam positivos para Nestina, que marca neurônios precursores, demonstrando que, de fato, nosso protocolo consegue produzir neuroesferas (Figura S1).

No mesmo sentido, nas fotos obtidas pelo microscópio ZOE, que os esferóides aderidos às placas (MW6) começam a se diferenciar em neurônios precursores e se espalhar pela placa, novamente confirmando que as esferas eram, de fato, neuroesferas compostas de precursores neurais (Figura S2).

Ainda, podemos observar nesse teste de padronização que as neuroesferas Wistar após a exposição à hipóxia química moderada (800 µM) apresentam um significativo do sinal de PI em relação ao grupo sem tratamento (*Untreated*) (Figura S3). No mesmo sentido, quando as células foram previamente tratadas com NAM e

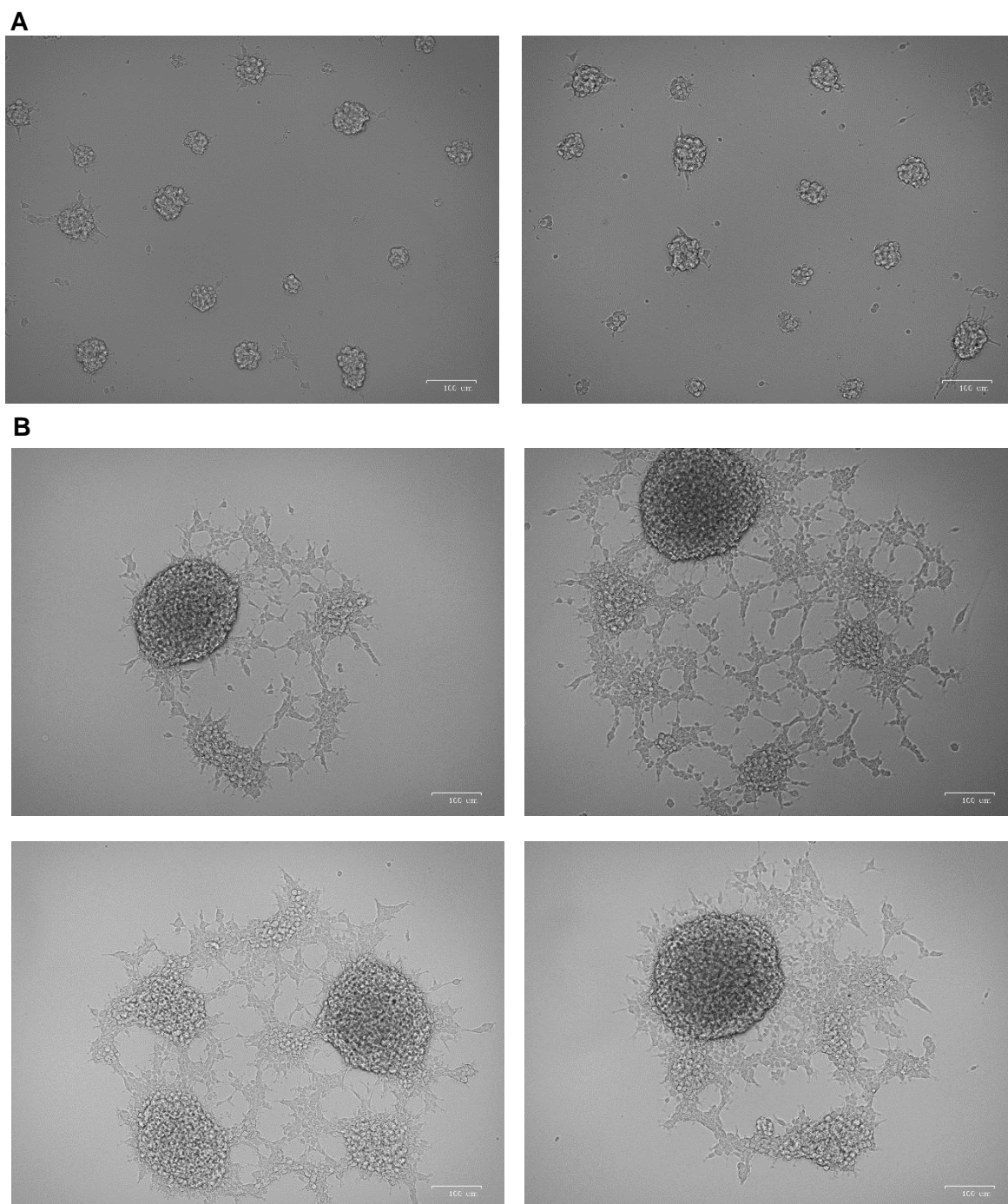
expostas a hipóxia, vemos um aumento do sinal do PI, também significativo, em relação ao grupo sem tratamento. Entretanto, não houve diferenças entre o grupo sem tratamento e exposto somente ao NAM (50  $\mu$ M) e, houve uma redução significativa do sinal do PI no grupo previamente tratado com NAM e exposto à hipóxia química moderada (Figura S3). Esses dados preliminares indicam que o tratamento prévio com NAM é capaz de proteger as neuroesferas da morte celular (Figura S3 e S4)

**Figura S1:** Representação da caracterização das neuroesferas Wistar com anticorpo Nestina e DAPI



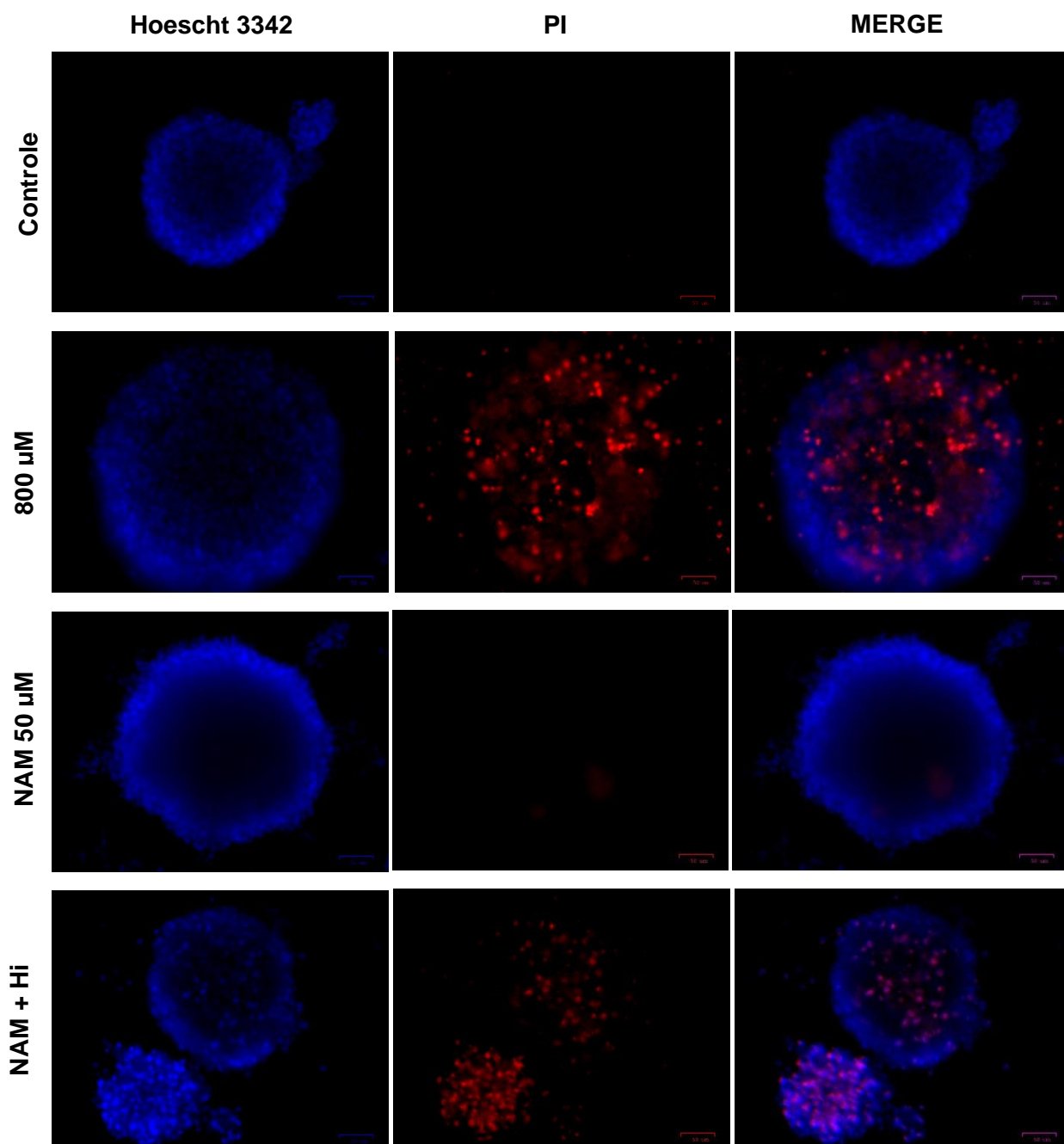
**Legenda:** Imunofluorescência foi realizada com anticorpo Nestina para marcação de neurônios precursores 1:500 (verde) e DAPI para a marcação do núcleo celular 1:10.000 (azul). Imagens adquiridas com a objetiva de 20x (escala de 100 µM). (A) Representação da imunofluorescência. Primeira fileira, representação do DAPI, segunda fileira representação da Nestina e terceira fileira representação do *merge* entre o Nestina e MAP2.

**Figura S2:** Representação das neuroesferas Wistar após subcultivo



**Legenda.** (A) neuroesferas cultivadas na MW96 ( $5 \times 10^3$  células por poço). (B) neuroesferas cultivadas na MW6 ( $10^4$  células por poço). As fotos foram obtidas com o microscópio de fluorescência *ZOE Fluorescent Cell Imager* (Biorad) na escala de 100  $\mu$ M.

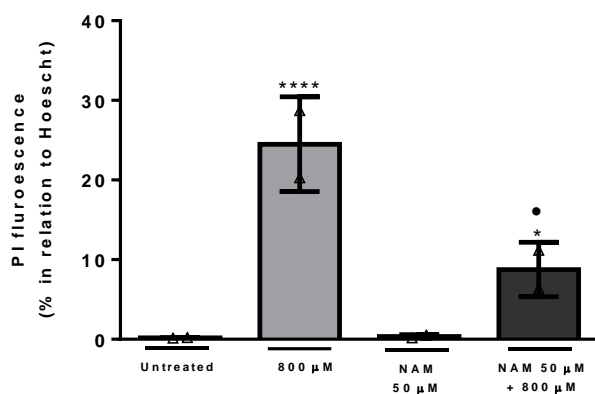
**Figura S3:** Representação do teste de viabilidade com Hoescht 3342 e iodeto de propídeo (PI). Neuroesferas Wistar sem tratamento, expostas somente a hipóxia química moderada (800  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas, tratadas apenas com NAM (50  $\mu\text{M}$ ) por 48 horas e previamente tratadas com NAM (48 horas) e expostas a hipóxia (NAM + Hi, 24)



**Legenda:** As fotos foram obtidas com as neuroesferas cultivadas na MW6, com o microscópio de fluorescência *ZOE Fluorescent Cell Imager* (Biorad) escala de 50  $\mu\text{M}$ . Primeira fileira, representação do Hoescht 3342, segunda fileira representação do PI e terceira fileira representação do *merge* entre o Hoescht e PI.



**Figura S4:** Representação gráfica do teste primário de viabilidade com neuroesferas Wistar



**Legenda:** Fluorescência do PI em relação a fluorescência do Hoescht. (N = 2). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e em porcentagem em relação ao respectivo grupo marcado com Hoescht. Análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0.05$ . e \* $p < 0.01$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  em relação ao respectivo grupo sem tratamento (Wistar); • $p < 0.00001$  em relação aos grupos expostos apenas a hipóxia (800  $\mu\text{M}$ ).

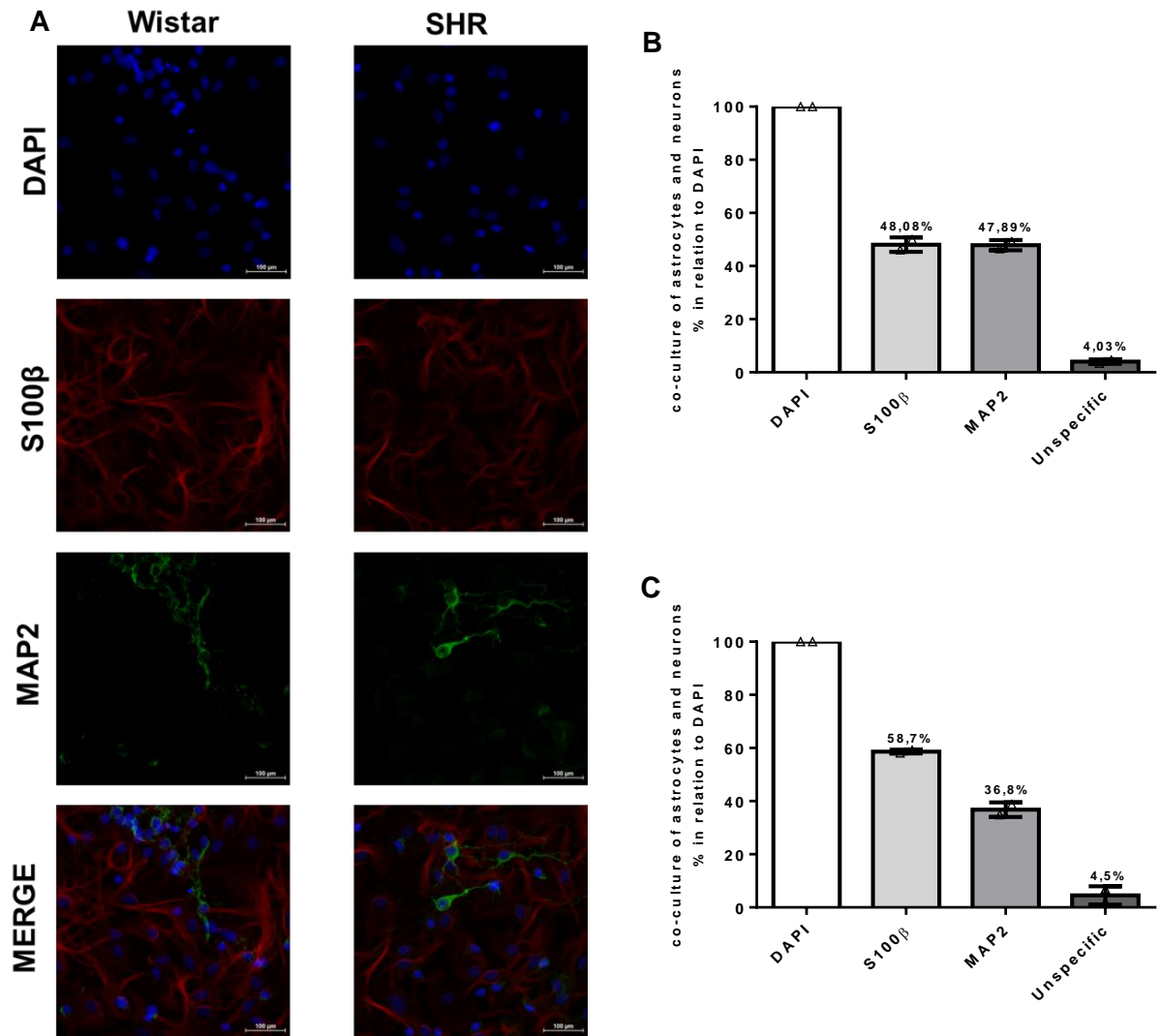
## **ANEXO B: Padronização da co-cultura entre neurônios e astrócitos**

Pelo fato de que a teoria do neurodesenvolvimento relaciona fatores ambientais e epigenéticos à etiologia da SZ, e pela verificação de que a cascata de hipóxia está envolvida no processo de disfunção mitocondrial nos astrócitos (células gliais de suma importância para o desenvolvimento neuronal) (E Silva et al., 2019), se faz necessário investigar o papel da hipóxia também em neurônios e em uma co-cultura (neurônio–astrócito). A importância da cultura celular mista está no fato de que para o entendimento da função neural e de seu metabolismo energético, bem como do efeito de uma situação de estresse como a hipóxia, a conectividade entre as células deve ser mantida, mimetizando ao máximo o ambiente cerebral (já que esses são os 2 principais tipos celulares). Entretanto, devido a pandemia do SARs-CoV-2 não conseguimos realizar os experimentos que gostaríamos, assim, realizamos apenas testes de padronização e caracterização do protocolo de cultura.

O método utilizado para a obtenção da co-cultura foi baseado em dados prévios da literatura (Scorisa et al., 2010) e adaptações feitas pelo nosso grupo. Resumidamente, os astrócitos e os neurônios foram cultivados conforme mencionado na seção metodologias. Então, após a confluência dos astrócitos e o processo de tripsinização, as células foram previamente cultivadas em lamínulas de 13 mm revestidas com Poli-D (ver seção metodologias) e mantidas na incubadora. Então, após a cirurgia, extração e dissociação dos neurônios, conforme mencionado na seção metodologia respectiva, foi adicionado 50% do volume de astrócitos contidos nas lamínulas, de neurônios, ou seja, se a lamínula continha 100.000 astrócitos, seria adicionado 50.000 neurônios. Após a adição dos neurônios, o meio de cultivo foi trocado para neurobasal suplementado com gentamicina (50 µg/ml), B27 (1,5%), glutamina (1,5 mM) e soro fetal bovino (1%). O meio foi trocado a cada 3 dias e o período total da cultura após a adição dos neurônios foi de 6 dias. Assim sendo, quando observamos que os neurônios começaram a se espalhar pelos astrócitos, a co-cultura foi utilizada para a caracterização, parte do processo de padronização que foi realizado até então (Figura S5).

Podemos observar na figura S5 B, que é a representação gráfica da co-cultura com células Wistar, que aproximadamente 50% da cultura era composta de astrócitos e de neurônios. No caso da figura S5 C, que é a representação gráfica da co-cultura de células SHR, vemos que 36,9% eram compostas de neurônios e 58% de astrócitos.

**Figura S5:** Caracterização da co-cultura entre neurônios e astrócitos



**Legenda:** Imunofluorescência foi realizada com anticorpo MAP2 para marcação de neurônios maduros 1:500 (verde); S100 $\beta$  (1:500) para marcação dos astrócitos e DAPI para a marcação do núcleo celular 1:10.000 (azul). Imagens adquiridas com a objetiva de 20x (escala de 100  $\mu$ M). (A) Representação da imunofluorescência, (B) gráfico de barras representativo da co-cultura com neurônios e astrócitos Wistar. (C) gráfico de barras representativo da co-cultura com neurônios e astrócitos SHR. (N = 2). Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão e normalizados em porcentagem pela quantidade total da marcação nuclear com DAPI (1:10.000).

## **ANEXO C: Projeto de Colaboração**

Ao observar os resultados obtidos com o uso do modulador Nicotinamida (NAM) sobre a função mitocondrial dos animais SHR, fizemos um projeto de colaboração com a Dr<sup>a</sup>. Elena Seranova formada pela Universidade de Birmingham e CEO da empresa NMN Bio® para investigar, *in vivo*, se o composto *nicotinamide mononucleotide* (NMN) (substrato da metabolização de NAM) é capaz de melhorar a função mitocondrial, bem como reverter o comportamento do tipo esquizóide apresentado pelos animais SHR. Desta forma, poderemos esmiuçar a participação da disfunção mitocondrial, oriunda da hipóxia, com os comportamentos alterados apresentados pelos animais SHR, além de propor um tratamento à base de um suplemento alimentar amplamente utilizado. O projeto foi avaliado e aprovado pela comissão de ética em pesquisa com animais da USP com um adendo ao CEUA (7646061120).

O NMN é um suplemento alimentar que tem se mostrado eficaz como uma fonte de NAD<sup>+</sup> melhorando a função mitocondrial. O NAD<sup>+</sup> é produzido pela reação ciclo enzimática da conversão de NAM para NMN para NAD<sup>+</sup> pela enzima *nicotinamide mononucleotide adenyltransferase* (NMNAPT). O NAD<sup>+</sup> é um metabólito vital necessário para mais de 500 reações enzimáticas, e a sua diminuição tem sido relacionado com uma gama de desordens psiquiátricas, incluindo a SZ. Vale dizer que perante uma situação de hipóxia, há um aumento da oxidação do NAD<sup>+</sup> para NADH, diminuindo seus níveis (Fuhrmann e Brune, 2017).

O tratamento com NMN (grau de pureza 99,8%) foi realizado via gavagem, uma vez que os suplementos alimentares a base desse composto são utilizados por via oral, por 30 dias consecutivos, 1 vez ao dia, na concentração de 250 mg/kg (concentração previamente estabelecida em estudos anteriores, Naia et al., 2017a,b). Desta maneira, poderemos estabelecer uma correlação entre os achados e a via de administração.

Foram solicitados inicialmente 12 animais (de um total de 24 aprovados pelo CEUA), sendo 6 Wistar e 6 SHR, para o teste inicial. Os animais solicitados tinham 2 meses de vida e o início do tratamento foi no 3<sup>o</sup> mês, dando um mês para a adequação do animal no biotério novo, bem como é o período em que os animais SHR começam a apresentar os comportamentos relacionados com a SZ (Peres et al., 2018). Os ratos Wistar são animais amplamente utilizados para experimentação e possuem todos seus hábitos, comportamentos e boa parte do genoma conhecidos,

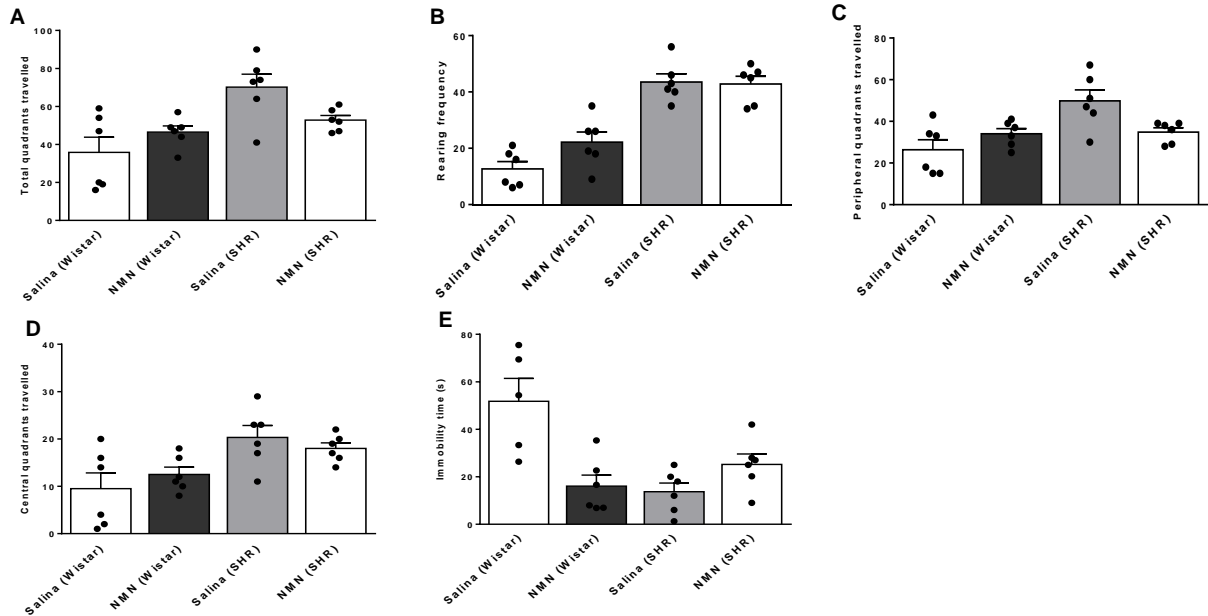
tornando assim mais fácil realizar comparações e correlações entre os achados comportamentais e moleculares. Já os animais SHR, são amplamente utilizados como modelos de hipóxia intrauterina e SZ, também tendo seu genoma conhecido, bem como hábitos e comportamentos. Os animais SHR são conhecidos como modelo de SZ, pois apresentam hiper locomoção (relacionado aos sintomas positivos da SZ), déficit de interação social (relacionado aos sintomas negativos da SZ), e déficits nos testes de memória aversiva (relacionados aos sintomas cognitivos da SZ) (Niigaki et al., 2019). Nesse sentido, realizamos esse teste primário e assim poderíamos verificar, realmente, se o composto alterava o comportamento dos animais.

Portanto, os testes comportamentais foram realizados quando os animais atingiram 4 meses de vida sendo:

1. campo aberto (Figura S6), para avaliar o comportamento exploratório dos animais, onde analisamos a quantidade de locomoção total (Figura S6 A), quantidade de levantamentos (Figura S6 B), quantidade de locomoção periférica (Figura S6 C) e locomoção central (Figura S6 D), bem como o tempo de imobilidade total (Figura S6 E).
2. interação social (Figura S7), para a verificação do comportamento social, onde analisamos locomoção total (Figura S7 A), quantidade de levantamentos (Figura S7 B), interação ativa (Figura S7 C), interação passiva (Figura S7 D) e interação total (Figura S7 E).
3. tarefa de medo condicionado ao contexto, para verificação da memória aversiva, onde analisamos o tempo de *freezing* (Figura S8 A) após o estímulo aversivo.

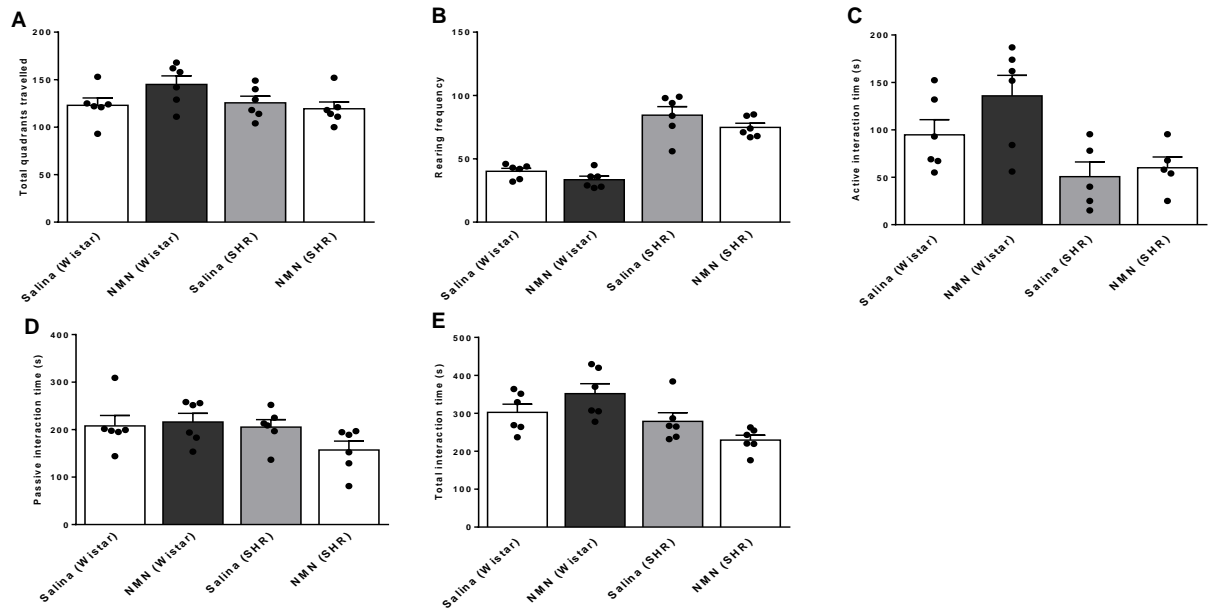
Com esses resultados, conseguimos por ora, observar que há uma diminuição na locomoção total no teste de campo aberto (Figura S6 A) e uma tendência de aumento no tempo de *freezing* no teste de medo condicionado ao contexto (Figura S8) dos animais SHR tratados com NMN, porém não há significância estatística. Portanto, para conseguirmos concluir o projeto e analisar minuciosamente os resultados precisamos aumentar nosso *N* experimental. No mesmo sentido, todos esses animais foram eutanasiados e os tecidos cerebrais foram coletados para analisar proteínas e genes envolvidos no metabolismo e dinâmica mitocondrial.

**Figura S6:** Projeto de Colaboração – Teste de Campo Aberto



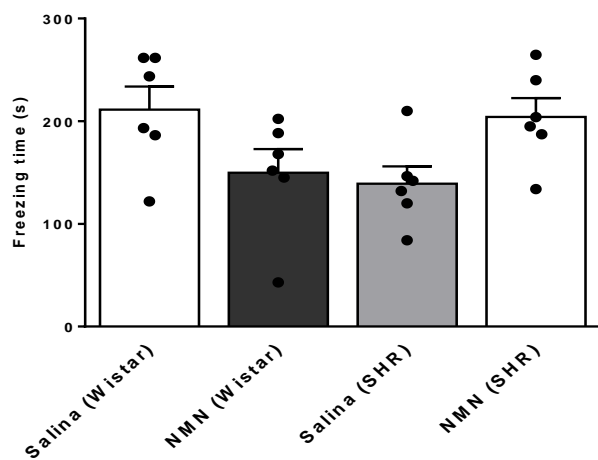
**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo da análise de locomoção total. (B) gráfico de barras representativo da análise de levantamentos. (C) gráfico de barras representativo da análise de locomoção periférica. (D) gráfico de barras representativo da análise de locomoção central. (E) gráfico de barras representativo da análise de tempo de imobilidade. (N = 6).

## Figuras S7: Projeto de Colaboração – Teste de interação social



**Legenda:** (A) gráfico de barras representativo da análise de locomoção total. (B) gráfico de barras representativo da análise de levantamentos. (C) gráfico de barras representativo da análise de interação ativa. (D) gráfico de barras representativo da análise de interação passiva. (E) gráfico de barras representativo da análise de interação total. (N = 6).

**Figura S8:** Projeto de Colaboração – Teste de medo condicionado ao contexto



**Figura S3:** gráfico de barras representativo da análise do tempo de *freezing* após o tratamento com NMN ou Salina. Gráfico de barras (N = 6).



## **ANEXO D: Programa Rutherford Fellowship – Estágio na Universidade de Birmingham**

Em 2019, durante o período de 30 dias, fui contemplado com a bolsa do programa *Rutherford Fellowship* para realizar um estágio na Universidade de Birmingham, United Kingdom (UK), no Instituto de Ciências sobre Câncer e Genômica, no laboratório do professor Dr. Sovan Sakar onde realizei diversos experimentos relacionados ao processo de autofagia celular.

O programa Rutherford fornece financiamento para oferecer bolsas de curto prazo que se baseiam em aprimorar as parcerias estratégicas globais entre universidades. Durante o período de estágio foi avaliado diversos parâmetros mitocondriais, como MMP, homeostase de cálcio e homeostase redox, bem como níveis de ATP e ADP e a razão NAD<sup>+</sup>/NADH, em amostras de células embrionárias humanas (hESCs) controle e hESCs com a falta do gene codificador da proteína *autophagy related protein 6* (ATG 6). Bem como, os mesmos parâmetros foram analisados em amostras neurônios IPS derivados de pacientes com a doença de Niemann-Pick. Essas análises geraram diversos resultados e um artigo em preprint na Cell Press denominado de *Nad<sup>+</sup> depletion mediates cytotoxicity in human neurons with autophagy deficiency*

**Preprint (CELL PRESS):** Sun, Congxin and Seranova, Elena and Cohen, Malkiel A. and Chipara, Miruna and Roberts, Jennie and Palhegyi, Adina M. and Acharjee, Animesh and Sedlackova, Lucia and Kataura, Tetsushi and Otten, Elsie G. and Panda, Prashanta K. and Kauffman, Kevin J. and Huerta-Uribe, Alejandro and Zatyka, Malgorzata and Silva, Luiz F.S.E. and Torresi, Jorge and Zhang, Shupeei and Ward, Carl and Kuechler, Erich R. and Cartwright, David and Trushin, Sergey and Trushina, Eugenia and Sahay, Gaurav and Buganim, Yosef and Lavery, Gareth G. and Gsponer, Joerg and Anderson, Daniel G. and Rosenstock, Tatiana R. and Barrett, Timothy and Maddocks, Oliver D.K. and Tennant, Daniel A. and Wang, Haoyi and Jaenisch, Rudolf and Korolchuk, Viktor I. and Sarkar, Sovan, NAD Depletion Mediates Cytotoxicity in Human Neurons With Autophagy Deficiency. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4052958> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4052958>.

**Figura S9:** Carta de confirmação de estágio do professor Sovan Sarkar



UNIVERSITY OF  
BIRMINGHAM



INSTITUTE OF  
CANCER AND  
GENOMIC SCIENCES

**Sovan Sarkar, PhD**

Birmingham Fellow  
Institute of Biomedical Research  
Institute of Cancer and Genomic Sciences  
College of Medical and Dental Sciences  
University of Birmingham  
Birmingham B15 2TT, United Kingdom

Former Fellow  
Hughes Hall  
University of Cambridge  
Cambridge CB1 2EW, United Kingdom

20<sup>th</sup> August 2019

**Confirmation letter of internship of Luiz Felipe Souza e Silva at University of Birmingham**

To whom it may concern:

I confirm that Luiz Felipe Souza e Silva, who is a PhD student at Santa Casa Medical School in Sao Paulo, was a visiting student in my laboratory at the University of Birmingham in UK for 30 days during the month of April 2019. He followed and executed several practical research procedures in the field of autophagy and neurodegeneration. Should you have any further questions, please do not hesitate to contact me.

Yours Sincerely,

Sovan Sarkar

E-mail: [s.sarkar@bham.ac.uk](mailto:s.sarkar@bham.ac.uk) ▪ Telephone: +44 (0)121 4146669 ▪ Fax: +44 (0)121 4145475  
Website: [www.birmingham.ac.uk/sovan-sarkar](http://www.birmingham.ac.uk/sovan-sarkar) | [www.sovansarkarlab.com](http://www.sovansarkarlab.com)

