

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Nathan Ryzewski Strogulski

**Adaptações metabólicas como potenciais componentes da  
terapia e biomarcadores prognósticos no TCE.**

Porto Alegre

2022

### CIP - Catalogação na Publicação

Strogulski, Nathan Ryzewski  
Adaptações metabólicas como potenciais componentes  
da terapia e biomarcadores prognósticos no TCE. /  
Nathan Ryzewski Strogulski. -- 2022.  
139 f.  
Orientador: Luis Valmor Cruz Portela.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Trauma cranioencefálico. 2. Mitocôndria. 3.  
Sistema Purinérgico. 4. Trealose. 5. Autofagia. I.  
Cruz Portela, Luis Valmor, orient. II. Título.

Nathan Ryzewski Strogulski

**Adaptações metabólicas como potenciais componentes da  
terapia e biomarcadores prognósticos no TCE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Porto Alegre

2022

## AGRADECIMENTOS

A ciência é uma arte colaborativa.

A construção desta tese só foi possível pelo esforço coletivo de uma série de pessoas às quais nutro um carinho e agradecimento que dificilmente pode ser espresso utilizando palavras. Aqui tento transmitir estes sentimentos à todos que me auxiliaram de alguma forma durante minha passagem pelo departamento de bioquímica.

Primeiramente, gostaria de estender a minha gratidão aos componentes das secretarias do ppg bioquímica e educação, Cléia, Giordano e Douglas, pelo apoio e paciência nestes últimos 6 anos. Agradeço também aos servidores e funcionários do departamento de bioquímica, responsáveis pelo bom funcionamento do biotério e outras amenidades indispensáveis para a execução do trabalho aqui apresentado. Extendo um agradecimento às chefias de departamento e coordenações do PPG, em especial à professora Fátima Guma, que lutaram incessantemente pela manutenção da qualidade deste programa, especialmente durante os 2 anos de pandemia de COVID-19.

Gostaria de transmitir o meu carinho aos meus colegas e grandes amigos Afonso e Marcelo, cuja companhia fez estes últimos anos ser extremamente mais prazerosa e divertida. Aos meus “ics”, Wanda, Vitória e Yuri gostaria de agradecer pelo apoio na execução dos projetos e a companhia nos diversos eventos do laboratório que deixarão saudosas memórias. Deixo meu agradecimento ao “Time Neurotrauma” especialmente Jean, Gisele e Eduardo Kalinine, que foram importantes modelos para minha formação. Extendo meu agradecimento aos excelentes colegas do Lab 26, Amanda Staldoni, Daniela Marques e Marcus Lara pelo companheirismo e “solidariedade” durante os difíceis períodos de minha formação. Agradeço também à professora Lisiane Porciúncula pelo auxílio oferecido durante todos os anos de minha formação científica.

Meu agradecimento muito mais que especial ao meu orientador Prof. Luis Valmor Portela, “Roska”, de quem aprendi muito mais do que ciência, e a quem tenho muito mais do que um chefe e orientador. Agradeço pelo apoio incondicional que sei que recebi, pelas correções que mereci e pelos ensinamentos que “seu amigo de são paulo” me transmitiu. Tu és o meu modelo de pesquisador, e espero um dia poder transmitir este legado aos meus futuros alunos. Tenho certeza que nosso vínculo irá se estender pra sempre, para tua infelicidade. Agradeço com toda a sinceridade à família do professor Roska, Elsa, Juliana e Isabela pelo acolhimento e companhia.

Aqui também retribuo o carinho e amor incondicionais devidos à minha família, que me deu mais do que carinho, acolhimento, e apoio financeiro, mas também me apoiou em minhas decisões, compreendeu minhas frequentes ausências e me auxiliou em tudo que pôde. Ofereço aos meus pais Vera Maria e Luis, e meu irmão Theo o carinho e gratidão de um abraço que não tem fim, e à minha esposa Radharani o afago e companhia de um amor que não tem limites. Agradeço profundamente também aos meus padrinhos Flávia e Fernando pelo carinho que sempre me transmitiram, e o cuidado oferecido. À minha tia Roselaine, agradeço pelos cuidados que me dá desde criança, e que me dá até hoje.

Agradeço finalmente, à todos os professores e alunos do departamento de bioquímica que contribuíram de forma direta ou indireta à este trabalho, bem como a banca pelo tempo dedicado à avaliação deste trabalho.

## Resumo

O trauma cranioencefálico é definido como uma lesão mecânica ao tecido encefálico, que está amplamente associada à mortalidade, e consequências crônicas aos pacientes que sobrevivem; particularmente neurodegeneração e prejuízos cognitivos. Apesar de ser fundamentalmente uma lesão mecânica as consequências clínicas do TCE têm como substrato principal alterações metabólicas que são desencadeadas imediatamente após à lesão, e que se perpetuam e difundem pelo tecido cerebral. Este dano secundário ao trauma, altera funções celulares, impede a recuperação e conduz as células para um caminho de neurodegeneração apoptótica. Portanto, entender e desvendar os componentes destas abnormalidades pode proporcionar indicadores clínicos de prognóstico e respostas a terapias, assim como alvos terapêuticos contra os mecanismos neurotóxicos associados ao TCE. O principal dilema atual relacionado ao TCE grave é sua limitação em relação à disponibilidade de arsenais terapêuticos efetivos e biomarcadores prognósticos específicos. Considerando o papel das alterações metabólicas na patofisiologia do trauma e suas consequências a longo prazo, realizamos dois estudos: (1) Um estudo pré-clínico para explorar o potencial neuroprotetor da trealose, considerado um indutor de autofagia AMPK dependente, cujo impacto na bioenergética após o TCE grave ainda não foi explorado; (2) Um estudo clínico, para desvendar as alterações no catabolismo purinérgico e identificar assinaturas purinômicas de mortalidade e de desfecho neurofuncional a longo prazo em pacientes com TCE grave. As principais descobertas desta tese revelam que a suplementação com trealose levou à melhora da atividade do complexo mitocondrial I e II nos estágios agudo e subagudo de recuperação do TCE, concomitante à atenuação de marcadores de neurodegeneração e redução do prejuízo cognitivo. Também, demonstramos no líquido cefalorraquidiano de pacientes com TCE, assinaturas do trauma sobre as taxas de interconversão de purinas, e que os níveis extracelulares de GTP e Guanosina no líquido possuem respectivamente, valor preditor de mortalidade a curto prazo e de desfechos clínicos funcionais desfavoráveis em longo prazo.

## **Abstract**

Traumatic brain injury is defined as a mechanical injury to brain tissue, largely associated with mortality, and chronic consequences for patients who survive, particularly neurodegeneration and cognitive impairment. The main current dilemma related to severe TBI is its limitation regarding the availability of effective therapeutic arsenals and specific prognostic biomarkers. Despite being fundamentally a mechanical injury, the clinical consequences of TBI have as their main substrate metabolic changes that are perpetuated and spread throughout the brain tissue. This secondary damage alters cellular functions, impedes recovery, and drives cells down a path of neurodegeneration. Therefore, understanding and unraveling the components of these abnormalities can provide clinical indicators of prognosis and responses to therapies as well as therapeutic targets against the neurotoxic mechanisms associated with TBI. Considering the role of metabolic alterations in the pathophysiology of trauma and its long-term consequences, we carried out two studies: (1) A preclinical study to explore the neuroprotective potential of trehalose, considered an inducer of AMPK-dependent autophagy, whose impact on bioenergetics after severe TBI had not yet been explored; and (2) A clinical study, to unravel changes in purinergic catabolism and identify purinomic signatures of mortality and long-term neurofunctional outcome in patients with severe TBI. The main findings of this thesis reveal that trehalose supplementation leads to improved mitochondrial complex I and II activity in the acute and subacute stages of TBI recovery, concomitant with attenuation of neurodegeneration markers and reduction of cognitive impairment. Also, we demonstrated in the cerebrospinal fluid of patients with TBI, a signature interconversion rate and dynamic of purines, and that the CSF levels of GTP and Guanosine respectively, display predictive value for short-term mortality and for unfavorable long-term functional clinical outcomes.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estrutura química da trealose e seu mecanismo de ação sobre a ativação de AMPK.

**Figura 2.** A cascata de degradação de purinas derivadas de adenina e guanina

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
ATP	Adenosina Trifosfato
IC50	Concentração inibitória média
mRS	Escala modificada de Rankin
NADH	Nicotinamida dinucleotídeo
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
PPAR $\gamma$	ator de proliferação peroxissomal gama
TCE	Trauma-cranioencefálico
TRE	Trealose
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1 O Trauma Cranioencefálico .....	1
1.2 O metabolismo energético cerebral como alvo terapêutico no TCE.....	2
1.3 O metabolismo de purinas como biomarcador de desfecho no trauma cranioencefálico....	7
<b>2. Objetivos</b> .....	12
<b>3. Publicações científicas</b> .....	13
3.1. Capítulo I: Early trehalose supplementation after severe traumatic brain injury preserves mitochondrial function and cognition in mice. ....	13
3.2. Capítulo II: Cerebrospinal fluid purinomics as a biomarker approach to predict outcome after severe traumatic brain injury. ....	43
<b>4. Discussão</b> .....	58
4.1 O metabolismo mitocondrial como alvo terapêutico no TCE.....	58
4.2 O metabolismo de purinas como ferramenta diagnóstica no TCE .....	61
<b>5. Conclusão</b> .....	64
<b>6. Referências</b> .....	65
<b>7. Produção científica complementar à tese:</b> .....	75
<b>Anexo I: Artigo publicado</b> .....	76
<b>Anexo II: Co-orientação de trabalho de conclusão de curso</b> .....	87

# 1. Introdução

## 1.1 O Trauma Cranioencefálico

O Trauma-cranioencefálico (TCE) é definido como uma injúria ao tecido cerebral causado por forças biomecânicas, podendo ser causado por cisalhamento do tecido cerebral por objetos penetrantes ou impactos ao tecido craniano, bem como por estiramento de axônios causado por desaceleração/aceleração brusca da cabeça (BLENNOW; HARDY; ZETTERBERG, 2012; JOHNSON; STEWART; SMITH, 2013). O TCE é bastante prevalente no mundo, visto que é a causa majoritária de morte em jovens adultos. Entretanto, esta grande prevalência e mortalidade não se reflete em um amplo arsenal terapêutico, limitando as possibilidades de manejo clínico dos pacientes (BRAUN CT, 2015). Além disto, o TCE apresenta um espectro de severidade, que é medido pela escala de coma de Glasgow, que estratifica as lesões em leves, moderadas e graves. Dentre os pacientes que são acometidos com TCE grave estima-se uma taxa de letalidade de 40% a curto prazo, com limitadas ferramentas para determinação de prognóstico em relação à sobrevivência. Em contrapartida, pacientes que sobrevivem a um TCE grave apresentam um risco mais elevado de apresentar doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas de forma precoce (BARNES *et al.*, 2018; JOHNSON *et al.*, 2017).

Apesar de ser consequência de um fenômeno biomecânico, existe uma associação direta entre alterações do metabolismo cerebral e a patofisiologia do TCE, que envolvem o metabolismo de proteínas, metabolismo energético e o metabolismo de moléculas com efeito neuromodulatório (HEADRICK *et al.*, 1994; SARKAR *et al.*, 2014;

SINGH *et al.*, 2006). Este dano secundário, neurobioquímico, do TCE é composto de processos adaptativos com o objetivo de reestabelecer a homeostasia cerebral, promovendo mecanismos imunes de reparo, autoregulação vascular cerebral e remoção de debris celulares, incluindo recaptção de neurotransmissores, como o glutamato. Entretanto, em muitos pacientes estes processos reparativos progridem para mecanismos maladaptativos que exacerbam a lesão inicial ao tecido cerebral, sustentadas fundamentalmente por processos de desequilíbrio neuroimune, disfunção energética, excitotoxicidade, e acúmulo de agregados protéicos neurotóxicos (LOANE; KUMAR, 2016; LYONS *et al.*, 2018; MCKEE *et al.*, 2009; STEFANI *et al.*, 2017).

## 1.2 O metabolismo energético cerebral como alvo terapêutico no TCE

A disfunção energética que sucede o TCE pode ser observada desde as primeiras horas após a lesão inicial, e já foi identificada por períodos mais longos (2 meses) em modelos experimentais (CARTERI *et al.*, 2019; LYONS *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2006). A contribuição da disfunção energética para a perpetuação de um processo neurodegenerativo crônico após o TCE se deve à grande atividade metabólica do tecido cerebral e à grande demanda energética da transmissão sináptica. A sustentação metabólica de uma sinapse funcional envolve mecanismos ativos que vão desde o bombeamento de íons para o processo de polarização e despolarização, à síntese, recaptção e degradação de neurotransmissores. Esta elevada demanda de ATP por todas as células envolvidas na sinapse tripartite (neurônios pré e pós sinápticos e astrócitos) é suprida pela alta densidade de mitocôndrias localizadas nas sinapses, bem como um aporte constante de substratos energéticos. Sabe-se que uma redução na

atividade do complexo I do sistema de transporte de elétrons se estabelece horas após a um TCE (SINGH *et al.*, 2006), e é sustentada de forma prolongada (LYONS *et al.*, 2018), comprometendo de forma substancial a produção de ATP na sinapse, prejudicando o suprimento energético para uma neurotransmissão apropriada. Em trabalhos realizados em nosso laboratório, e corroborados por trabalhos realizados por grupos internacionais, sugeriu-se um grau de relação causal entre disfunção energética e déficits cognitivos após o TCE, que é passível de modulação utilizando drogas que aumentam a atividade mitocondrial (CARTERI *et al.*, 2019; PATEL *et al.*, 2009; SAUERBECK *et al.*, 2011).

Uma abordagem inovadora sobre as disfunções mitocondriais após o TCE consiste na indução de processos fisiológicos de reciclagem de mitocôndrias disfuncionais acumuladas durante o dano secundário. A macroautofagia é o processo majoritário de *clearance* mitocondrial, que envolve a formação de uma vesícula que direciona material citoplasmático, inclusive mitocôndrias, para degradação lisossomal (YORIMITSU; KLIONSKY, 2005). Este processo é amplamente regulado pela disponibilidade substratos energéticos, sendo induzida em situações de baixo aporte de substratos (KIM *et al.*, 2011), um mecanismo de ação comum a drogas pró-autofágicas como a Trealose (DEBOSCH *et al.*, 2016; MARDONES; RUBINSZTEIN; HETZ, 2016). Por meio da autofagia o tecido cerebral é capaz de degradar conteúdo celular como proteínas e organelas e promover a reciclagem de seus aminoácidos, carboidratos e lipídeos constituintes (RABINOWITZ; WHITE, 2010). Trabalhos recentes sugerem que durante o TCE uma inibição da autofagia ocorre de forma sustentada, prejudicando o processamento e degradação de proteínas mal-dobradas e reciclagem de mitocôndrias disfuncionais, favorecendo agregação proteica e disfunção energética (SARKAR *et al.*, 2014). Assim, o uso de drogas capazes de promover autofagia no TCE, como a Trealose

(Figura 1A), são uma estratégia promissora para prevenir dois componentes centrais da neurodegeneração associada ao dano secundário.

Em um trabalho (PORTBURY *et al.*, 2017), que investigou os efeitos comportamentais do tratamento com trealose em um modelo de TCE em camundongos, foi demonstrado que sua administração promoveu uma atenuação do prejuízo cognitivo causado pelo trauma cerebral. Entretanto, os dados obtidos não permitiram evidenciar efeitos pró-autofágicos da trealose no modelo, colocando em questão quais seriam os mecanismos subjacentes da neuroproteção cognitiva promovida pela trealose. Acredita-se que o efeito de indução autofágica promovida pela trealose se deve ao bloqueio de transportadores de glicose (GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4 e GLUT8); tendo maior afinidade pelo transportador GLUT1 (Figura 1B) (DEBOSCH *et al.*, 2016). O bloqueio do transporte de glicose promove um remodelamento metabólico buscando a manutenção da homeostase energética celular, induzindo a ativação de AMPK e vias celulares catabólicas como a oxidação de ácidos graxos, proteólise e a autofagia (ZHANG *et al.*, 2018). De fato, a trealose já foi investigada na terapia de distúrbios metabólicos como esteatose hepática não alcoólica, por promover uma robusta lipólise, oxidação de ácidos graxos e consequentemente produção de corpos cetônicos (KADING; FINCK; DEBOSCH, 2021). Desta forma, é possível que o efeito neuroprotetor da trealose no TCE não é restrito à ativação da autofagia, e envolva também um remodelamento do metabolismo mitocondrial no cérebro que atenua a disfunção bioenergética inerente ao dano secundário.

Além da indução da autofagia pela trealose, outros estudos já buscaram o metabolismo mitocondrial como alvo terapêutico no TCE, por exemplo, drogas com a capacidade de desacoplar o consumo de substratos energéticos no sistema de transporte de elétrons da síntese de ATP têm demonstrado resultados promissores, mas falharam

do ponto de vista clínico por apresentarem uma janela terapêutica muito estreita dada sua elevada toxicidade (PANDYA *et al.*, 2007). Outros trabalhos investigaram o potencial do suprimento de substratos energéticos “alternativos” à mitocôndria, como a oxidação de corpos cetônicos. Estudos neste sentido têm consistentemente demonstrado que corpos cetônicos como o  $\beta$ -hidroxibutirato provêm aporte energético complementar ao metabolismo mitocondrial no TCE, e têm sido relacionada a vantagens clínicas em outras patologias (APPELBERG; HOVDA; PRINS, 2009; DAVIS *et al.*, 2008; MAALOUF *et al.*, 2007). O uso de dietas cetogênicas para terapia de doenças neurológicas como a epilepsia já é bem estabelecido, promovendo em um estudo uma redução de 30% no número de crises em pacientes pediátricos. Entretanto, é reportado na clínica a dificuldade na adesão dos pacientes à este tipo de terapia, dado o elevado custo e os efeitos colaterais do consumo de gorduras em uma dieta cetogênica tradicional (proporção de 3:1 ou 4:1, lipídeos:não-lipídeos) (KANG *et al.*, 2004; SONDHAI *et al.*, 2020). Outra alternativa já explorada no metabolismo mitocondrial como alvo terapêutico no TCE é o uso de fármacos capazes de modular a atividade enzimática de complexos mitocondriais. Entre estes fármacos pode-se citar por exemplo a pioglitazona, um agonista do fator de proliferação peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ), que atua também sobre a proteína mitoNEET que é reguladora do transporte de cálcio mitocondrial e conseqüentemente da atividade de enzimas do sistema de transporte de elétrons que são regulados alostericamente por  $Ca^{2+}$  (SAUERBECK *et al.*, 2011).

De fato, o papel do cálcio sobre a função mitocondrial reside num componente central no dano secundário do TCE; porque o comprometimento da função mitocondrial após o TCE pode ser atribuída em parte a mecanismos relacionados à excitotoxicidade glutamatérgica. Durante o TCE, uma liberação sustentada de glutamato pelo rompimento de neurônios, desencadeia uma hiperativação de receptores ionotrópicos

glutamatérgicos do tipo NMDAR, que pela abertura de seu canal iônico aumenta a permeabilidade ao cálcio (HOFFE; HOLAHAN, 2022). A entrada excessiva de cálcio nas células neurais é contrabalanceada com mecanismos de tamponamento, como sua entrada na matriz mitocondrial. Apesar de mecanisticamente obscuro, já foi reportado consistentemente um acúmulo de cálcio mitocondrial em modelos animais de TCE; que parece sustentar o comprometimento do equilíbrio iônico e a capacidade de formação e dissipação de potenciais elétricos, necessários para a produção de ATP (CARTERI *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2006; STARKOV; POLSTER; FISKUM, 2002; VERCESI *et al.*, 2018). Em condições normais, a mitocondria é capaz de realizar o efluxo de cálcio sob demanda, permitindo a otimização da produção de ATP. Entretanto, já se observou que após o TCE este mecanismo de efluxo é comprometido (CARTERI *et al.*, 2019), prejudicando o manejo mitocondrial do cálcio citosólico proveniente da hiperativação de receptores NMDA, efetivamente associando excitotoxicidade e disfunção bioenergética como fatores comuns e sinérgicos no dano secundário ao TCE.

O bloqueio farmacológico de receptores NMDA, reduzindo o influxo excessivo de cálcio e desencadeamento de cascatas excitotóxicas é amplamente utilizado na terapia de doenças neurodegenerativas, como pacientes com Alzheimer em estágio avançado. O uso de cloridrato de memantina causa o bloqueio do canal de cálcio presente no receptor NMDA, retardando a progressão da perda neuronal. Apesar de pacientes com TCE apresentarem elevados níveis de glutamato liquórico (STEFANI *et al.*, 2017), o uso de antagonistas de receptor NMDA ainda não possui liberação de agências reguladoras que dêem suporte à sua aplicabilidade clínica no TCE (MUIR, 2006).

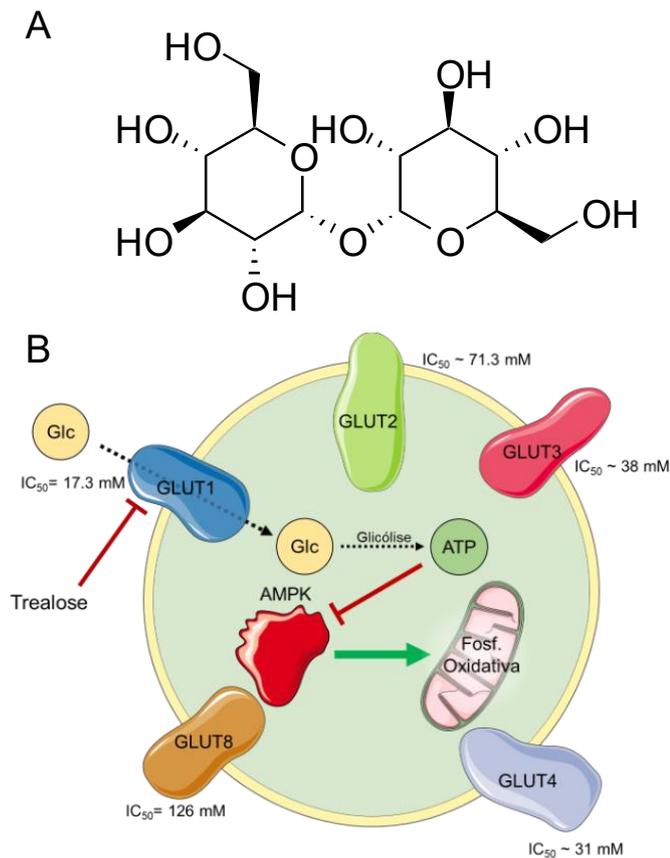


Figura 1. **(A)** Estrutura química da Trealose. **(B)** Representação esquemática do mecanismo proposto de modulação do metabolismo mitocondrial pela trealose. A Trealose causa a inibição da captação de glicose (Glc) por proteínas GLUT, indicadas acima e acompanhadas da respectiva concentração inibitória média da trealose ( $IC_{50}$ ). A redução na captação de glicose promove a redução do aporte de ATP e a consequente ativação de AMPK e vias catabólicas, como a fosforilação oxidativa. Fonte: Figura do autor.

### 1.3 O metabolismo de purinas como biomarcador de desfecho no trauma cranioencefálico

Fisiologicamente, parte da resposta adaptativa cerebral à excitotoxicidade é a modulação do sistema glutamatérgico por receptores purinérgicos. Os receptores

purinérgicos são classificados em receptores do tipo P1, com afinidade maior à adenosina, e receptores do tipo P2, com afinidade maior a outros nucleotídeos e nucleosídeos, como o ATP e o ADP. Os receptores do tipo P2 são subdivididos em receptores P2X (canais de íons dependentes de ligantes) e receptores P2Y (receptores acoplados à proteína G). Existem atualmente 4 subtipos de receptores purinérgicos do tipo P1(A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>), sete subunidades de receptores P2X (1-7), que se organizam em proteínas triméricas, homo- e heteromultiméricas, e oito subtipos de receptores P2Y(1,2,4,6,11,12,13,14) (BURNSTOCK, 2018). Cada um destes diferentes subtipos de receptor P2 apresenta graus variáveis de seletividade para os diferentes nucleosídeos e nucleotídeos purinérgicos, fazendo com que a composição de purinas e seus derivados determine o tipo de receptor a ser ativado (AGOSTINHO *et al.*, 2020; BURNSTOCK, 2020). A ativação de receptores capazes de promover a atenuação da excitotoxicidade glutamatérgica, como receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> (GERBATIN *et al.*, 2017; MATOS *et al.*, 2012), é dependente da formação de seus ligantes pela cascata de degradação das purinas.

Dentre as purinas mais relevantes do ponto de vista fisiológico, destacam-se as purinas derivadas da guanina e da adenina. O processo de catabolismo destas purinas ocorre de forma sequencial iniciando em nucleotídeos tri-fosfato, e culminando nos nucleosídeos adenosina e guanosina. Adicionalmente, nucleosídeos e nucleotídeos monofosfato de adenina e guanina (AMP e GMP) convergem para formação de intermediários comuns, como IMP, inosina, xantina, hipoxantina e ácido úrico (Figura 2). Esta cascata de degradação é catalizada enzimaticamente por enzimas extra e intracelulares, como as ectonucleotidases (ENTPDases), que influenciam as proporções individuais de cada purina, sugerindo que alterações na atividade de uma ou mais

enzimas podem causar perturbações na resposta da sinalização purinérgica no cérebro após o TCE (BURNSTOCK, 2018, 2020).

Ainda não é completamente elucidado o papel do sistema purinérgico sobre o dano secundário no trauma, mas evidências pré-clínicas sugerem um comprometimento de seu papel neuromodulatório e um prejuízo à sua cascata de degradação (HEADRICK *et al.*, 1994; LUSARDI, 2009; SOLAROGLU *et al.*, 2005; TAYAG *et al.*, 1996). Dado seu papel regulatório sobre a sinalização glutamatérgica, e a associação entre excitotoxicidade e desfechos clínicos como mortalidade e neurodegeneração, é possível hipotetizar que alterações no metabolismo das purinas, causadas pelo trauma cranioencefálico, poderiam apresentar assinaturas bioquímicas com valor preditivo. Isto porque, do ponto de vista prognóstico, observa-se um papel cada vez mais proeminente da excitotoxicidade glutamatérgica como um alvo viável e acurato para predição de desfechos clínicos em pacientes com TCE, sendo os níveis liquóricos de glutamato associados com mortalidade na UTI de pacientes com TCE grave (STEFANI *et al.*, 2017). Não obstante, é razoável imaginar que a resposta biológica de moléculas modulatórias do sistema glutamatérgico apresente gerência sobre a extensão da excitotoxicidade pós-TCE, influenciando diretamente os desfechos clínicos. Dentre os mecanismos de modulação do sistema glutamatérgico, a sinalização purinérgica se destaca pela fina modulação sináptica mediada por seus diferentes tipos de receptores, ubíquos no SNC, e que podem apresentar natureza excitatória ou inibitória (CUNHA, 2016). Sabe-se que esses receptores apresentam seletividade para os diferentes intermediários do metabolismo das purinas, desta forma um importante fator na regulação da sinalização purinérgica é a interconversão de purinas e seus derivados na sua cascata de degradação enzimática (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006; SCHMIDT; LARA; SOUZA, 2007). Evidências experimentais sugerem um acúmulo de purinas e seus

derivados em modelos de TCE em roedores (BELL *et al.*, 1998; HEADRICK *et al.*, 1994; JACKSON *et al.*, 2016; LUSARDI, 2009; SOLAROGLU *et al.*, 2005; TAYAG *et al.*, 1996). Entretanto, o efeito do TCE no metabolismo das purinas permanece obscuro e seu potencial como biomarcador prognóstico em pacientes inexplorado.

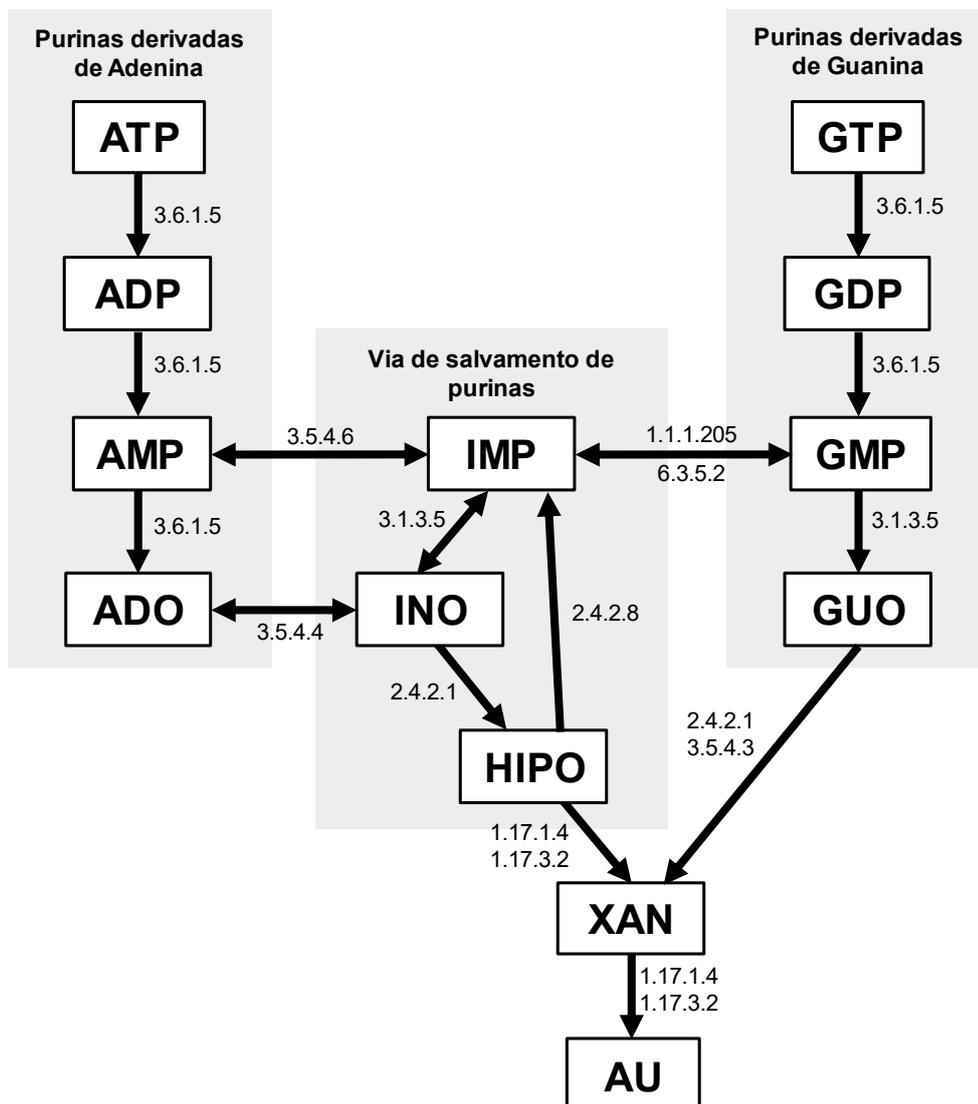


Figura 2: Cascata de degradação das purinas derivadas de Adenosina e Guanina. O fluxograma apresenta as etapas da degradação sequencial de nucleotídeos e nucleosídeos derivados de purinas até a formação de ácido úrico. As setas pretas indicam reações enzimáticas, com a ponta da seta informando a direção da reação, e os números adjacentes a identificação da(s) enzima(s) catalizadora(s) da respectiva

etapa segundo a E.C. (Enzyme Commission). Abreviaturas: (ADO) Adenosina; (INO) Inosina; (GUO) Guanosina; (HIPO) Hipoxantina; (XAN) Xantina; (AU) Ácido Úrico.

Desta forma, apesar do conhecimento atual sobre as alterações ao metabolismo energético e purinérgico associados ao dano secundário ao TCE, pouco têm se avançado na tradução deste conhecimento em ferramentas terapêuticas e prognósticas das consequências agudas e crônicas do TCE.

Neste contexto, foi investigado em dois estudos independentes o papel da modulação do metabolismo como alvo terapêutico e prognóstico no TCE. No primeiro estudo, foi utilizado o modelo de TCE grave em camundongos para investigar o potencial neuroprotetor do uso de trealose, um indutor autofágico, sobre a disfunção mitocondrial, proteotoxicidade, e desfechos comportamentais. Em um segundo estudo, investigamos em líquido de pacientes com TCE grave admitidos à UTI, associações entre os níveis de purinas 2 horas após a admissão com mortalidade a curto prazo e cognição após 2 anos. Do ponto de vista translacional buscamos ampliar a oferta de biomarcadores com valor preditivo para a alta mortalidade do TCE grave, com o intuito de minimizar a mortalidade e revelar novas possibilidades terapêuticas em um ambiente que possui um arsenal limitado de intervenções clínicas.

## 2. Objetivos

Objetivo geral:

Neste trabalho pretendemos investigar as modulações na função mitocondrial, proteotoxicidade e comportamento promovidas pela trealose em camundongos em um modelo de TCE grave, e identificar assinaturas bioquímicas no metabolismo de purinas de pacientes acometidos com TCE grave como biomarcadores de prognóstico.

Objetivos específicos:

- a) Investigar se o uso de trealose promove melhora na função cognitiva de camundongos submetidos a um modelo de TCE severo.
- b) Investigar se a trealose reduz os prejuízos mitocondriais causados pelo TCE a curto prazo.
- c) Investigar se os efeitos agudos da trealose sobre o metabolismo energético no TCE são sustentados.
- d) Identificar alterações causadas pelo TCE nos níveis de purinas em relação a pacientes controle
- e) Identificar perfis purinômicos associados a mortalidade até 3 dias.
- f) Buscar associações entre níveis de purinas e desfechos neurofuncionais após o TCE
- g) Investigar as alterações promovidas pelo TCE na cascata de degradação das purinas.

### **3. Publicações científicas**

A presente tese se apresenta organizada no formato de uma coletânea de artigos científicos.

3.1. Capítulo I: Early trehalose supplementation after severe traumatic brain injury preserves mitochondrial function and cognition in mice.

Autores: Strogulski, NR1; Rodolphi, MS1; Kopczynski, A1; Dorneles, W1; De Oliveira, VG1; Santos, P1; Carteri, RB1 Hansel, G1; Fillipi-Chiela, EC2,3; Portela, LV1\*

Artigo a ser submetido ao periódico *Nutritional Neuroscience*

3.2. Capítulo II: Cerebrospinal fluid purinomics as a biomarker approach to predict outcome after severe traumatic brain injury.

Autores: Nathan R. Strogulski; Marco Antonio Stefani; Ana Elisa Böhmer; Gisele Hansel; Marcelo S. Rodolphi; Afonso Kopczynski; Vitória G. de Oliveira; Eduarda T. Stefani; Juliana V. Portela; André P. Schmidt; Jean Pierre Oses; Douglas H. Smith; Luis V. Portela.

Artigo publicado no periódico *Journal of Neurochemistry*.

DOI:10.1111/jnc.1559

## 4. Discussão

### 4.1 O metabolismo mitocondrial como alvo terapêutico no TCE.

O dano secundário ao TCE, causado por alterações bioquímicas como disfunção mitocondrial, perda da proteostase e alterações neuroquímicas é amplamente associado à neurodegeneração progressiva após a lesão. Um potencial mecanismo capaz de contrapor componentes-chave do dano secundário, como a agregação protéica e acúmulo de mitocôndrias disfuncionais é a autofagia (SARKAR *et al.*, 2014). Além da depuração de conteúdo neurotóxico, a autofagia é associada com processos de reciclagem de organelas como a mitocôndria, o que no contexto do TCE poderia se refletir em uma melhora no metabolismo energético.

Na primeira seção deste trabalho utilizamos a trealose, um indutor autofágico, em um modelo de TCE grave em camundongos, e observamos um significativo efeito mitoprotetor a curto e longo prazo, bem como uma redução em indicadores de neurotoxicidade e comprometimento da memória espacial após a lesão. Ainda há expressiva controvérsia em relação aos mecanismos subjacentes à neuroproteção promovida pela trealose (LEE; YOON; LEE, 2018). Trabalhos anteriores já dissociaram efeitos protetores da trealose em doenças neurológicas da modulação da autofagia, sugerindo que a trealose apresenta propriedades de chaperona capazes de prevenir a agregação de oligômeros peptídicos e proteicos, como  $A\beta_{40}$  e huntingtina, respectivamente (DIMASI *et al.*, 2017; KRÜGER *et al.*, 2012; SARKAR *et al.*, 2007; TANJI *et al.*, 2015). Em nosso trabalho adicionamos evidências que sugerem a trealose como potencial agente terapêutico no TCE, indicando que ela promove a atenuação de componentes moleculares do dano secundário de forma aguda e que promove efeito neuroprotetor que se estende até 15 dias após a injúria, por mecanismos que não se limitam à indução da autofagia.

Apesar de ser observado nos animais que receberam trealose um aumento de reguladores da autofagia (pAMPK/AMPK), os componentes específicos da maquinaria autofágica não foram alterados após 3 dias de tratamento. Coletivamente, esses achados não dão evidências que indiquem à indução do fluxo autofágico pela trealose. O

aumento observado na razão do imunoconteúdo de pAMPK(T172)/AMPK após 3 dias de tratamento com trealose em animais que foram submetidos a um modelo de TCE pode se refletir em uma ativação de vias de biogênese mitocondrial, ou também exercer um efeito regulatório sobre as vias metabólicas que convergem à fosforilação oxidativa, ambas favorecendo a restauração das funções mitocondriais após a lesão (HERZIG; SHAW, 2018). Não existe na literatura atual, evidência que associe o uso de trealose e mecanismos de mitogênese. Aqui indicamos que o aumento na razão pAMPK(T172)/AMPK neste grupo de animais ocorre de forma concomitante a um aumento na respiração mitocondrial de sinaptossomas sustentada pelo complexo I, mas não pela combinação de complexo I e II mitocondriais, tanto 3 quanto 15 dias após a injúria, sugerindo um efeito proeminente da trealose sobre a atividade do complexo I no TCE.

Tais achados sugerem que a maior respiração mitocondrial a curto e longo prazo promovida pela trealose após o TCE pode ser sustentada por um aumento do fluxo de substratos metabólicos nos complexos mitocondriais. De fato, estudos pre-clínicos indicam que a trealose promove beta-oxidação hepática; o que está associado à produção de corpos cetônicos (ZHANG *et al.*, 2018). A oxidação de corpos cetônicos no tecido cerebral forneceria aporte metabólico para a formação de NADH que mediaría o aumento da atividade do complexo I mitocondrial após o tratamento com trealose, mas não justifica seus efeitos sobre outras funções mitocondriais, como manejo de cálcio e formação e dissipação do potencial de membrana (LAIRD *et al.*, 2013). Estes achados botam em questão os efeitos da trealose sobre a integração do metabolismo cerebral e sistêmico, abrindo também escopo para a investigação de seus efeitos mitoprotetores via receptores cerebrais de corpos cetônicos como GPR43 e GPR109A no TCE (MIYAMOTO *et al.*, 2019; REZQ; ABDEL-RAHMAN, 2016; STILLING *et al.*, 2016).

O aumento da respiração mitocondrial no grupo TRE poderia também ser sustentada por processos mitofágicos, um mecanismo de degradação autofágica seletiva de mitocôndrias. Tal processo permitiria a reciclagem de mitocôndrias disfuncionais, promovendo a biogênese de mitocôndrias novas. Um importante regulador deste processo, o fator de transcrição PGC1a (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) (PFANNER; WARSCHEID; WIEDEMANN, 2019), não apresentou diferenças significativas no grupo TRE, sugerindo que não há uma modificação expressiva da biogênese mitocondrial pela trealose. Reforça esse conceito, o fato de que o efeito sustentado da trealose sobre a função mitocondrial é

aparentemente restrito ao complexo I, indicando seletividade de efeito sobre um componente específico do sistema de transporte de elétrons, o que não seria atingido com um processo de reciclagem mitocondrial completa.

Outros componentes de função mitocondrial, como o influxo e efluxo de cálcio e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, também foram influenciados positivamente pela suplementação com trealose após o TCE. Uma capacidade sustentada de manejo de cálcio, especialmente em condições onde a hiperativação de receptores NMDA é achado comum, pode prover condições para a atenuação dos efeitos deletérios do acúmulo citoplasmático de cálcio, bem como permite a manutenção da atividade mitocondrial. Uma análise piloto realizada durante esta tese sugeriu que a trealose atenuou a ativação de marcadores pró-apoptóticos (Bax/BCL-2) e a ativação de calpaínas, reforçando a contribuição da trealose sobre a sinalização de cálcio no TCE.

Adicionalmente, o tratamento com trealose por 15 dias culminou com uma redução na razão do imunoconteúdo de pTau(S396)/Tau, demonstrando uma redução em mediadores de proteotoxicidade comuns a pacientes e modelos em roedores de TCE (HAWKINS *et al.*, 2013; MCKEE *et al.*, 2009). A redução dos marcadores de hiperfosforilação de Tau nos animais tratados com trealose é acompanhada de uma significativa redução do comprometimento cognitivo, e já foi relatada em outros modelos de doenças neurodegenerativas (RODRÍGUEZ-NAVARRO *et al.*, 2010).

Este estudo não permite assumir a ausência da contribuição da autofagia como componente da neuroproteção oferecida pela trealose, que já foi amplamente demonstrada em diversos modelos, inclusive de TCE. Consideramos que a avaliação de funções autofágicas nesse estudo poderia ter se beneficiado do uso de drogas inibidoras lisossomais, como a leupeptina, cloreto de amônia ou cloroquina, para a visualização do fluxo autofágico (KLIONSKY *et al.*, 2021). Entretanto, salientamos que este trabalho demonstra primariamente os efeitos da trealose sobre atividade mitocondrial no cérebro, adicionando um novo alvo de ação para esta droga cujo mecanismo ainda é incerto.

De forma geral, nossos achados na primeira seção deste estudo sugerem que a trealose promove efeitos neuroprotetores no TCE grave, mediado por uma melhora na função bioenergética mitocondrial aguda e crônica, com impactos sobre a hiperfosforilação de Tau e memória, indicando que modulações no metabolismo energético apresentam significativo potencial terapêutico no trauma cranioencefálico e o papel central da mitocôndria no dano secundário à injúria.

## 4.2 O metabolismo de purinas como ferramenta diagnóstica no TCE

Na segunda seção deste estudo, providenciamos a primeira evidência na literatura de que a avaliação dos níveis liquoóricos de purinas no contexto agudo apresentam validade preditiva sobre desfechos clínicos de pacientes com TCE grave. Aqui, propomos uma avaliação integrada dos níveis liquoóricos de purinas, numa abordagem “purinômica”, para buscar assinaturas biológicas associadas ao TCE, buscando compreender as alterações causadas sobre o metabolismo purinérgico e suas consequências clínicas. Nossos achados principais identificam o GTP liquoórico como um preditor sensível de mortalidade até 3 dias após a internação e a guanósina liquoórica como preditor de função neurológica a longo-prazo (dois anos após a internação). Também, a as correlações entre os níveis de purinas resultou num modelo mecanístico que sugere as alterações no catabolismo de purinas promovido pelo TCE.

A busca por biomarcadores em fluidos corporais com potencial diagnóstico e prognóstico têm sido tópico central da pesquisa no TCE; colocando o metabolismo de purinas e a sinalização purinérgica como um interessante alvo a ser explorado. O sistema purinérgico possui componentes bem estabelecidos no sistema nervoso central que compartilham localização e funções com a sinapse tripartite, bem como microglias e oligodendrócitos. Entre estes componentes destacam-se transportadores, receptores e ecto-NTPDases que são capazes de regular a nível mecanístico a natureza da sinalização purinérgica e seus efeitos sobre a neurotransmissão, mediado pela concentração relativa de cada metabólito purinérgico (BURNSTOCK, 2018). Em trabalhos anteriores, já demonstramos uma alteração no metabolismo de purinas após uma crise convulsiva em ratos, com um aumento na atividade de ENTPases de guanina e adenina que acompanha temporalmente um aumento em outros indicadores de dano neuronal (NSE) e astrocitário (S100B) (BÖHMER *et al.*, 2011). Além disso, outros autores já sugeriram que perturbações na sinalização purinérgica pode ser um fator epileptogênico após o TCE, sugerindo que alterações nas concentrações extracelulares de purinas pode influenciar também sobre desfechos neurológicos (CANAS *et al.*, 2018; WELTHA; REEMMER; BOISON, 2019).

Entre os mecanismos que contribuem para desfechos neurológicos de curto e longo prazo modulados pelo sistema purinérgico pode-se destacar a excitotoxicidade glutamatérgica (STEFANI *et al.*, 2017). O catabolismo de purinas apresenta efeitos

neuroprotetores anti-glutamatérgicos, promovido particularmente pela adenosina e guanosina, que poderiam ser capazes de contrapor a hiperativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA associada à excitotoxicidade (CANAS *et al.*, 2018; DOBRACHINSKI *et al.*, 2019). Em trabalhos anteriores, demonstramos nesta mesma coorte de pacientes que um aumento nos níveis liquóricos de glutamato está associado à mortalidade após TCE grave (STEFANI *et al.*, 2017), ressaltando o papel do sistema glutamatérgico a curto-prazo após a injúria e dando importância à sua modulação pela sinalização purinérgica neste contexto.

Estudos clínicos relativos à concentração de purinas no TCE ainda são escassos, entretanto estudos em roedores já demonstraram um aumento agudo nos níveis de ADP, adenosina, inosina e hipoxantina que é consistente com os achados em nosso estudo (BELL *et al.*, 1998; HEADRICK *et al.*, 1994). Adicionamos à literatura descrições primárias de um aumento nos níveis de GDP, guanosina, inosina, xantina e hipoxantina 3 horas após a internação de pacientes com TCE grave, bem como uma consistente redução nos níveis de IMP em relação aos pacientes controle, demonstrando uma assinatura purinômica característica após o trauma. Além disso, GTP, GDP, IMP e xantina apresentavam concentrações elevadas em pacientes com TCE que não sobreviveram até 3 dias após a internação.

Em relação à especificidade e sensibilidade de GTP, GDP, IMP e xantina em determinar prognóstico a curto prazo em pacientes com TCE severo apenas GTP apresentou valor preditivo significativo. Um potencial mecanismo que dá lastro biológico à natureza preditiva do GTP no TCE é um aumento na ativação de receptores do tipo Rho, particularmente receptores RhoA e RhoB, que apresentam um aumento de expressão agudamente à lesão em análises *post-mortem* e um aumento de sua cascata de sinalização em modelos pre-clínicos de TCE que normalmente são associados à morte neuronal (BRABECK *et al.*, 2004; DUBREUIL *et al.*, 2006). Estes receptores atuam em respostas cerebrais a lesões regulando o tonus cerebrovascular, ativação microglial e astrocitária, regeneração axonal e neuroplasticidade. Tal papel é corroborado em nossos achados pela associação de elevação dos níveis de GTP e mortalidade após o TCE.

Adicionalmente, buscamos na assinatura purinérgica do trauma, identificar potenciais biomarcadores de prognóstico a longo prazo, utilizando a escala modificada de Rankin (mRS) 2 anos após a internação. Nossos dados demonstram que apenas os níveis de guanosina apresentaram correlação com a escala neurofuncional (mRS), em detrimento de outras purinas. A administração exógena de guanosina tem efeitos bem

reconhecidos sobre a excitotoxicidade e disfunção mitocondrial em doenças neurológicas, quem também são componentes centrais da neurodegeneração progressiva que sucede o TCE (GERBATIN *et al.*, 2019; JURKOWITZ *et al.*, 2002; SCHMIDT *et al.*, 2000). Baseado nestes achados, propomos que mesmo um acúmulo endógeno de guanosina nas fases iniciais da lesão é capaz de atenuar a progressão do dano neuronal e declínio funcional após o trauma. Apesar do ponto de vista mecanístico a sinalização de purinas derivadas de guanina, particularmente a guanosina, ainda ser pouco elucidado; seus efeitos biológicos sobre a sinalização glutamatérgica são inegáveis. Em um par de trabalhos anteriores, a administração de guanosina exógena demonstrou relevante efeito neuroprotetor, causando atenuação do déficit cognitivo após o TCE; sendo associado mecanisticamente à uma melhora na função mitocondrial, mediada pelo receptor P1A<sub>1</sub> e P1A<sub>2A</sub> (DOBRACHINSKI *et al.*, 2019; GERBATIN *et al.*, 2017, 2019). Considerando os efeitos sinápticos da ativação de receptores A<sub>2A</sub>, seria possível hipotetizar que a redução da sensibilidade de receptores NMDA promovida pela ativação de A<sub>2A</sub> reduz o dano causado pela entrada de cálcio na mitocôndria, sustentando a atividade mitocondrial após o TCE. Desta forma, o direcionamento do metabolismo purinérgico em direção à formação de guanosina e adenosina poderiam representar um mecanismo endógeno de proteção ao trauma.

Uma análise posterior permitiu que fosse demonstrado nesse trabalho as alterações promovidas pelo TCE sobre a interconversão de purinas dos controles, que pode ser extrapolado como uma representação de como o TCE altera o metabolismo extracelular de purinas etapa-a-etapa. Destacamos particularmente que após o TCE, correlações negativas presentes nos pacientes controle são perdidas, sugerindo o desacoplamento de reações e a perda de mecanismos de feedback responsáveis por controlar o fluxo de purinas na cascata de degradação, que favorecem o acúmulo de adenosina e guanosina no líquido.

É interessante considerar também o papel da sinalização purinérgica em outros tipos celulares neurais, particularmente astrócitos e micróglia. Tanto astrócitos quanto micróglia apresentam receptores purinérgicos que contribuem para seu metabolismo celular e processos de polarização (AGOSTINHO *et al.*, 2020; CALOVI; MUT-ARBONA; SPERLÁGH, 2019; LOPES; CUNHA; AGOSTINHO, 2021). É possível considerar por exemplo o papel da guanosina e da adenosina sobre a captação astrocitária de glutamato, amplamente influenciada por receptores do tipo A<sub>2A</sub>, (MATOS *et al.*, 2012) como um mecanismo que atenua a excitotoxicidade que sucede ao TCE. De forma

equivalente, é possível esperar que o desequilíbrio da sinalização purinérgica a longo prazo possa contribuir para o estado de neuroinflamação crônica estabelecido pelo TCE, particularmente pelo fato da ativação de receptores do tipo P2X7 e P2Y12 contribuírem para o remodelamento metabólico de células microgлияis, que assumem uma polarização do tipo M2, amplamente pró-inflamatória (FAN *et al.*, 2020; HAYNES *et al.*, 2006; SEKAR *et al.*, 2018).

Apesar de ser impossível discriminar a contribuição de tipos celulares para o perfil purinérgico em nosso estudo, cabe salientar que esta mesma coorte apresentou alterações similares no conteúdo de marcadores de morte neuronal e astrocitária (NSE e S100B) (BÖHMER *et al.*, 2011), sugerindo uma contribuição equivalente de ambos tipos celulares à concentração liquórica de purinas imediatamente após a injúria. Acreditamos que seria relevante a realização de estudos adicionais, que avaliassem de forma detalhada o remodelamento do metabolismo purinérgico após o TCE, bem como qual a contribuição da secreção ativa de purinas intracelulares após a injúria para este perfil.

## **5. Conclusão**

Considerando a importância clínica do TCE e sua limitada oferta de terapia específica e ferramentas de prognóstico, a busca por novas ferramentas farmacológicas, e biomarcadores sensíveis e específicos, demanda grande esforço da comunidade científica. Nossos estudos corroboram neste sentido, e demonstram o metabolismo energético e o metabolismo purinérgico como potenciais alvos para o desenvolvimento de intervenções farmacológicas para a atenuação da neurodegeneração a longo prazo, bem como biomarcadores viáveis de desfechos clínicos agudos e crônicos. Tais achados podem abrir caminho para outras investigações que apresentem o metabolismo mitocondrial como o foco mecanístico para a terapia do TCE, bem como estudos que investiguem as características tipo-celular específicas para o efeito do TCE e da trealose sobre o metabolismo energético. Neste sentido, também o perfil purinômico observado neste estudo, dá sentido à busca por uma descrição mecanística detalhada do efeito do TCE sobre a cascata de degradação de purinas, o que pode fornecer novos efetores moleculares para a terapia aguda do trauma cranioencefálico.

## 6. Referências

AGOSTINHO, Paula *et al.* Purinergic signaling orchestrating neuron-glia communication.

**Pharmacological Research**, [s. l.], v. 162, 2020. Disponível em: Acesso at: 27 Apr. 2022.

APPELBERG, K. Sofia; HOVDA, David A.; PRINS, Mayumi L. The Effects of a Ketogenic Diet on Behavioral Outcome after Controlled Cortical Impact Injury in the Juvenile and Adult Rat. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 497–506, 2009.

BARNES, Deborah E *et al.* Association of Mild Traumatic Brain Injury With and Without Loss of Consciousness With Dementia in US Military Veterans. **JAMA neurology**, United States, v. 75, n. 9, p. 1055–1061, 2018.

BELL, MICHAEL J. *et al.* Interstitial Adenosine, Inosine, and Hypoxanthine Are Increased after Experimental Traumatic Brain Injury in the Rat. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 163–170, 1998. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/neu.1998.15.163>.

BLENNOW, Kaj; HARDY, John; ZETTERBERG, Henrik. The Neuropathology and Neurobiology of Traumatic Brain Injury. **Neuron**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 886–899, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627312010367>. Acesso at: 4 Nov. 2018.

BÖHMER, Ana Elisa *et al.* Neuron-Specific Enolase, S100B, and Glial Fibrillary Acidic Protein Levels as Outcome Predictors in Patients With Severe Traumatic Brain Injury. **Neurosurgery**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 1624–1631, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/neurosurgery/article/68/6/1624/2607646>.

BRABECK, Christine *et al.* Lesional Expression of RhoA and RhoB following Traumatic Brain Injury in Humans. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 697–706, 2004. Disponível em: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/0897715041269597>.

BRAUN CT, Kuenzler M. Mortality and Outcome of Severe Traumatic Brain Injury in a Swiss Level One Trauma Center. **Emergency Medicine: Open Access**, [s. l.], v. 05, n. 01, 2015.

Disponível em:

[http://www.omicsgroup.org/journals/mortality\\_and\\_outcome\\_of\\_severe\\_traumatic\\_brain\\_injury-2165-7548.1000226.php?aid=36096](http://www.omicsgroup.org/journals/mortality_and_outcome_of_severe_traumatic_brain_injury-2165-7548.1000226.php?aid=36096).

BURNSTOCK, Geoffrey. Introduction to Purinergic Signalling in the Brain. *In*: BARAŃSKA, Jolanta (org.). **Glioma Signaling**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 1–12. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30651-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30651-9_1).

BURNSTOCK, Geoffrey. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, [s. l.], v. 2, p. 239821281881749, 2018.

CALOVI, Stefano; MUT-ARBONA, Paula; SPERLÁGH, Beáta. Microglia and the Purinergic Signaling System. **Neuroscience**, [s. l.], v. 405, p. 137–147, 2019. Disponível em: Acesso at: 27 Apr. 2022.

CANAS, Paula M. *et al.* Neuronal Adenosine A2A Receptors Are Critical Mediators of Neurodegeneration Triggered by Convulsions. **eneuro**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. ENEURO.0385-18.2018, 2018.

CARTERI, Randhall B. *et al.* Testosterone Administration after Traumatic Brain Injury Reduces Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 36, n. 14, p. 2246–2259, 2019.

CUNHA, Rodrigo A. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration?. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 139, n. 6, p. 1019–1055, 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.13724>.

DAVIS, Laurie M. *et al.* Fasting is neuroprotective following traumatic brain injury. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 86, n. 8, p. 1812–1822, 2008.

DEBOSCH, Brian J *et al.* Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. **Science signaling**, United States, v. 9, n. 416, p. ra21, 2016.

DIMASI, Pasquale *et al.* Modulation of p-eIF2  $\alpha$  cellular levels and stress granule assembly / disassembly by trehalose. **Nature Publishing Group**, [s. l.], p. 1–10, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep44088>.

DOBRACHINSKI, Fernando *et al.* Guanosine Attenuates Behavioral Deficits After Traumatic Brain Injury by Modulation of Adenosinergic Receptors. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 3145–3158, 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-018-1296-1>.

DUBREUIL, Catherine I. *et al.* Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 198, n. 2, p. 361–369, 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488605004589>.

FAN, Xiao *et al.* P2X7 Receptor (P2X7R) of Microglia Mediates Neuroinflammation by Regulating (NOD)-Like Receptor Protein 3 (NLRP3) Inflammasome-Dependent Inflammation After Spinal Cord Injury. **Medical Science Monitor**, [s. l.], v. 26, 2020.

GERBATIN, Rogério R. *et al.* A1 rather than A2A adenosine receptor as a possible target of Guanosine effects on mitochondrial dysfunction following Traumatic Brain Injury in rats. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 704, p. 141–144, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394019302484>.

GERBATIN, Rogério da Rosa *et al.* Guanosine Protects Against Traumatic Brain Injury-Induced Functional Impairments and Neuronal Loss by Modulating Excitotoxicity, Mitochondrial Dysfunction, and Inflammation. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 54, n. 10, p. 7585–7596, 2017. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-016-0238-z>.

HAWKINS, Bridget E. *et al.* Rapid Accumulation of Endogenous Tau Oligomers in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 288, n. 23, p. 17042–17050, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23632019>. Acesso at: 14 Aug. 2017.

HAYNES, Sharon E *et al.* The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1512–1519, 2006.

HEADRICK, John P. *et al.* Dissociation of Adenosine Levels from Bioenergetic State in Experimental Brain Trauma: Potential Role in Secondary Injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 853–861, 1994. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.1994.107>.

HERZIG, Sébastien; SHAW, Reuben J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 121–135, 2018.

HOFFE, Brendan; HOLAHAN, Matthew R. Hyperacute Excitotoxic Mechanisms and Synaptic Dysfunction Involved in Traumatic Brain Injury. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 15, 2022.

JACKSON, Edwin K. *et al.* Purines: forgotten mediators in traumatic brain injury. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 137, n. 2, p. 142–153, 2016. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.13551>.

JOHNSON, Victoria E. *et al.* Traumatic Brain Injury as a Trigger of Neurodegeneration. In: **ADVANCES IN NEUROBIOLOGY**. [S. l.: s. n.], 2017. p. 383–400. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-57193-5\\_15](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-57193-5_15).

JOHNSON, Victoria E.; STEWART, William; SMITH, Douglas H. Axonal pathology in traumatic brain injury. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 246, p. 35–43, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488612000337>.

JURKOWITZ, Marianne S. *et al.* Adenosine, Inosine, and Guanosine Protect Glial Cells During Glucose Deprivation and Mitochondrial Inhibition: Correlation Between Protection and ATP Preservation. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 535–548, 2002. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.1998.71020535.x>.

- KADING, Jacqueline; FINCK, Brian N; DEBOSCH, Brian J. Targeting hepatocyte carbohydrate transport to mimic fasting and calorie restriction. **The FEBS journal**, [s. l.], v. 288, n. 12, p. 3784–3798, 2021.
- KANG, Hoon Chul *et al.* Early- and Late-onset Complications of the Ketogenic Diet for Intractable Epilepsy. **Epilepsia**, [s. l.], v. 45, n. 9, p. 1116–1123, 2004.
- KIM, Joungmok *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 132–141, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2152>.
- KLIONSKY, Daniel J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. **Autophagy**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–382, 2021. Disponível em: Acesso at: 27 Apr. 2022.
- KRÜGER, Ulrike *et al.* Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose. **NBA**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 2291–2305, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.009>.
- LAIRD, Melissa D. *et al.* Augmentation of Normal and Glutamate-Impaired Neuronal Respiratory Capacity by Exogenous Alternative Biofuels. **Translational Stroke Research**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 643–651, 2013.
- LEE, He-Jin; YOON, Ye-Seul; LEE, Seung-Jae. Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 712, 2018.
- LOANE, David J; KUMAR, Alok. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. **Experimental neurology**, [s. l.], v. 275 Pt 3, n. 0 3, p. 316–327, 2016.
- LOPES, Cátia R; CUNHA, Rodrigo A; AGOSTINHO, Paula. Astrocytes and Adenosine A2A Receptors: Active Players in Alzheimer's Disease. **Frontiers in neuroscience**, [s. l.], v. 15, p.

666710, 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34054416>. Acesso at: 27 Apr. 2022.

LUSARDI, T. Adenosine Neuromodulation and Traumatic Brain Injury. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], 2009.

LYONS, Danielle N. *et al.* A Mild Traumatic Brain Injury in Mice Produces Lasting Deficits in Brain Metabolism. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 35, n. 20, p. 2435–2447, 2018.

Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/neu.2018.5663>.

MAALOUF, M. *et al.* Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. **Neuroscience**, [s. l.], v. 145, n. 1, p. 256–264, 2007.

MARDONES, Pablo; RUBINSZTEIN, David C; HETZ, Claudio. Mystery solved: Trehalose kickstarts autophagy by blocking glucose transport. **Science signaling**, United States, v. 9, n. 416, p. fs2, 2016.

MATOS, Marco *et al.* Adenosine A2A receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes. **Glia**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 702–716, 2012.

MCKEE, Ann C. *et al.* Chronic Traumatic Encephalopathy in Athletes: Progressive Tauopathy After Repetitive Head Injury. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, [s. l.], v. 68, n. 7, p. 709–735, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/jnen/article-lookup/doi/10.1097/NEN.0b013e3181a9d503>. Acesso at: 13 Aug. 2017.

MIYAMOTO, Junki *et al.* Ketone body receptor GPR43 regulates lipid metabolism under ketogenic conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 116, n. 47, p. 23813–23821, 2019.

MUIR, K. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. **Current Opinion in Pharmacology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 53–60, 2006.

PANDYA, Jignesh D. *et al.* Post-Injury Administration of Mitochondrial Uncouplers Increases Tissue Sparing and Improves Behavioral Outcome following Traumatic Brain Injury in Rodents. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 798–811, 2007.

PATEL, Samir P *et al.* Differential effects of the mitochondrial uncoupling agent, 2,4-dinitrophenol, or the nitroxide antioxidant, Tempol, on synaptic or nonsynaptic mitochondria after spinal cord injury. **Journal of neuroscience research**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 130–140, 2009.

PFANNER, Nikolaus; WARSCHEID, Bettina; WIEDEMANN, Nils. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 267–284, 2019.

PORTBURY, Stuart D. *et al.* Trehalose improves traumatic brain injury-induced cognitive impairment. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1–19, 2017.

RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and Metabolism. **Science**, [s. l.], v. 330, n. 6009, p. 1344–1348, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21127245>. Acesso at: 6 Apr. 2018.

REZQ, S.; ABDEL-RAHMAN, A. A. Central GPR109A Activation Mediates Glutamate-Dependent Pressor Response in Conscious Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 356, n. 2, p. 457–466, 2016.

ROBSON, Simon C.; SÉVIGNY, Jean; ZIMMERMANN, Herbert. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11302-006-9003-5>.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, Jose A *et al.* Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 423–438, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996110001658>.

SARKAR, Chinmoy *et al.* Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. **Autophagy**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 2208–2222, 2014.

SARKAR, Sovan *et al.* Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and  $\alpha$ -synuclein. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 8, p. 5641–5652, 2007.

SAUERBECK, Andrew *et al.* Pioglitazone attenuates mitochondrial dysfunction, cognitive impairment, cortical tissue loss, and inflammation following traumatic brain injury. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 227, n. 1, p. 128–135, 2011.

SCHMIDT, André Prato *et al.* Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Research**, [s. l.], 2000.

SCHMIDT, André P.; LARA, Diogo R.; SOUZA, Diogo O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 116, n. 3, p. 401–416, 2007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725807001568>.

SEKAR, Ponarulsevam *et al.* AMPK-dependent and independent actions of P2X7 in regulation of mitochondrial and lysosomal functions in microglia. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 83, 2018.

SINGH, Indrapal N *et al.* Time Course of Post-Traumatic Mitochondrial Oxidative Damage and Dysfunction in a Mouse Model of Focal Traumatic Brain Injury: Implications for Neuroprotective Therapy. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 1407–1418, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600297>.

SOLAROGLU, Ihsan *et al.* Increased xanthine oxidase activity after traumatic brain injury in rats. **Journal of Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 273–275, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967586804003844>.

SONDHI, Vishal *et al.* Efficacy of Ketogenic Diet, Modified Atkins Diet, and Low Glycemic Index Therapy Diet Among Children With Drug-Resistant Epilepsy. **JAMA Pediatrics**, [s. l.], v. 174, n. 10, p. 944, 2020.

STARKOV, Anatoly A.; POLSTER, Brian M.; FISKUM, Gary. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 220–228, 2002.

STEFANI, Marco A. *et al.* Elevated glutamate and lactate predict brain death after severe head trauma. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, United States, v. 4, n. 6, p. 392–402, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/acn3.416>.

STILLING, Roman M. *et al.* The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis?. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 99, p. 110–132, 2016.

TANJI, Kunikazu *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications Trehalose intake induces chaperone molecules along with autophagy in a mouse model of Lewy body disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 465, n. 4, p. 746–752, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.076>.

TAYAG, Emilio C. *et al.* Cerebral uric acid increases following experimental traumatic brain injury in rat. **Brain Research**, [s. l.], v. 733, n. 2, p. 287–291, 1996. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899396006695>.

VERCESI, Anibal E. *et al.* Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 129, p. 1–24, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584918309742>.

WELTHA, Landen; REEMMER, Jesica; BOISON, Detlev. The role of adenosine in epilepsy. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 151, p. 46–54, 2019. Disponível em: Acesso at: 27 Apr. 2022.

YORIMITSU, T; KLIONSKY, D J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. **Cell death and differentiation**, [s. l.], v. 12 Suppl 2, p. 1542–1552, 2005. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.cdd.4401765>. Acesso at: 17 Mar. 2018.

ZHANG, Yiming *et al.* TFEB-dependent induction of thermogenesis by the hepatocyte SLC2A inhibitor trehalose. **Autophagy**, [s. l.], 2018.

## **7. Produção científica complementar à tese:**

Adicionalmente à produção científica central deste trabalho, foram produzidos um artigo científico, demonstrando distinções entre os efeitos metabólicos cerebrais do uso de hormônios androgênicos em camundongos adultos e velhos, publicado no periódico *Neurochemical Research*, 2022 (ANEXO I); um capítulo de livro, Academic Press, Elsevier, 2021; que aborda o estado-da-arte do uso de esteróides anabólicos androgênicos na terapia do trauma cranioencefálico (ANEXO II); bem como uma co-orientação de trabalho de conclusão de curso, composta de uma revisão sistemática intitulada “The neurogenic potential of NG2-Glia in Neurotrauma: a systematic review” do aluno Yuri da Rosa Rigo, do curso de Biotecnologia da UFRGS, cujo artigo está em fase de preparação (ANEXO III). As publicações se encontram anexas a esta tese.

## **Anexo I: Artigo publicado**

### ***Annex file I: Published Article***

**Periódico: Neurochemical Research, 2022**

**Nandrolone supplementation promotes AMPK activation and divergent <sup>18</sup>FDG-PET brain connectivity in adult and aged mice.**

Strogulski, N.R.; Kopczynski, A.; De Oliveira, V.G.; Carteri, R.B.; Hansel, G.; Venturin, G.T.; Greggio, S.; DaCosta, J.C.; De Bastiani, M.A., Rodolphi, M.S.; Portela, L.V.

**Anexo II: Co-orientação de trabalho de conclusão de  
curso**

***Annex file II: Co-supervision of undergraduate thesis***

**O potencial neurogênico da NG2-Glia no neurotrauma: uma revisão  
sistemática.**

**Aluno: Yuri da Rosa Rigo**

**Curso de biotecnologia, UFRGS**

**10 de Novembro de 2021**

**Título do artigo que compõe o trabalho:**

The neurogenic potential of NG2-Glia in Neurotrauma: a systematic review

Yuri da Rosa Rigo, Radharani Benvenuti, Luis Valmor Portela, Nathan R

Strogulski\*.