

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Afonso Kopczynski de Carvalho

**Transplante mitocondrial melhora as respostas locomotoras e bioenergéticas medulares
após concussões repetidas**

Porto Alegre

2019

Afonso Kopczynski de Carvalho

**Transplante mitocondrial melhora as respostas locomotoras e bioenergéticas medulares
após concussões repetidas**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Luís Valmor Cruz Portela

Porto Alegre
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

CIP - Catalogação na Publicação

DE CARVALHO, AFONSO
Transplante mitocondrial melhora as respostas
locomotoras e bioenergéticas medulares após
concussões repetidas / AFONSO DE CARVALHO. -- 2019.
65 f.
Orientador: Luis Portela.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Bioquímica. 2. Trauma crânio encefálico. 3.
Mitocôndria. I. Portela, Luis, orient. II. Título.

Afonso Kopczynski de Carvalho

**Transplante mitocondrial melhora as respostas locomotoras e bioenergéticas medulares
após concussões repetidas**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 17 de 12 de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Professor Eduardo Cremonese Filippi Chiela - UFRGS

Professor Daniel Pens Gelain - UFRGS

Professor Luis Valmor Cruz Portela - UFRGS (orientador)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à minha família, meus irmãos Viviane, Marcelo, Marcinha e Bárbara que sempre foram modelos a se seguir e apesar de as vezes eu “sumir” nunca deixaram de estar presentes me ajudando quando necessário sem precisar chamar duas vezes. Aos meus sobrinhos Alexandre, Guilherme e Davi, agradeço imensamente, pois mesmo que não saibam eles me inspiram todos os dias a tentar ser uma pessoa melhor. Agradeço e peço desculpas a minha madrasta Neiva que sempre me atura ajuda todos os dias, pelo cuidado e carinho que tem com meu pai.

Agradeço a meus pais que são, sem dúvidas nenhuma, as pessoas que mais me apoiam e admiram. Vocês são a minha grande inspiração para tudo na vida e a deixam muito mais fácil e leve. Pai, teu apoio incondicional é sem dúvidas o maior bem que eu tenho, muito obrigado.

O restante da minha família que entendeu os motivos de eu não conseguir mais ser tão presente, mas mesmo assim nunca deixou de ser receptiva nos poucos momentos de encontro, muito obrigado.

Agradeço imensamente ao Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores, pois foi ali que encontrei o que desejo fazer durante minha vida, os conhecimentos e vivências adquiridos me mudaram. Às pessoas que por ali passaram e me ensinaram, muito obrigado! Agradeço também as “meninas” do laboratório da professora Lisi. Em especial, gostaria de agradecer aos meus amigos Nathan e Marcelo que fizeram toda a jornada mais fácil e prazerosa porque me mostraram que trabalho, diversão, respeito e amizade podem estar sim muito conectadas.

Agradeço de forma especial a família Portela que sempre me receberam muito bem nos momentos mais diversos que consigo me lembrar. Sempre foram muito carinhosos e atenciosos, mesmo que as vezes eu não merecesse. Obrigado Elsa, Juliana e Isabella. Mas principalmente quero agradecer meu mentor, não apenas nesse trabalho, mas mentor na ciência e, principalmente, na vida o Professor Doutor Luís Valmor Cruz Portela, Roska. Por mais que ser um pesquisador muito famoso que ninguém conheça seja legal é uma pena o mundo não saber mais sobre ti. Muito obrigado, você mudou minha vida.

RESUMO

Concussões repetidas (CR) levam ao desenvolvimento da encefalopatia traumática crônica (ETC), cujos mecanismos envolvem alterações proteicas e mitocondriais. Frequentemente os atletas que sofrem CR apresentam, além de sintomas neuropsicológicos, uma diminuição da capacidade motora, problemas de equilíbrio, perda de coordenação e de força nos membros, o que sugere uma possível expansão do dano primário no cérebro para a medula espinhal. Entretanto, investigações sobre os potenciais mecanismos ainda são limitadas. O objetivo deste trabalho foi investigar se CR propagam alterações bioenergéticas mitocondriais do cérebro para a medula espinhal, e dessa maneira, propor uma terapia inovadora com base no transplante de mitocôndrias.

Camundongos CF1, machos de 90 dias de idade foram submetidos à 3 concussões (1 cada 72 h). Os parâmetros biomecânicos foram: profundidade: 5 mm, velocidade, 5,7 m/s; e tempo de permanência no local, 0,1s. Após 24 h os animais receberam uma injeção intratecal de 5 μ L de salina ou mitocôndrias isoladas de córtex cerebral, originando os grupos: controle (CT), transplante de mitocôndria (MIT), CR e CR-MIT, (n=12 por grupo). Vinte-quatro horas após o transplante mitocondrial os animais foram submetidos a testes motores como campo aberto (CA), teste do cilindro (TC), beam walk (BW); e de força dos membros superiores (grip strength, GS). O imunoconteúdo dos marcadores de neurodegeneração (pTAU^{ser396}/TAU, clivagem de α -espectrina e clivagem de Caspase 3) e proteínas mitocondriais (TOM20 e PGC1 α) foram dosadas em homogeneizados de córtex, hipocampo, hipotálamo, terço proximal e terço distal da medula. Em mitocôndrias isoladas dos terços medulares foi realizado um painel de ensaios mitocondriais.

Os animais submetidos a CR apresentaram uma diminuição coordenação de movimentos simétricos, equilíbrio e força nos membros superiores (TC, BW e GS) o que foi revertido pelo transplante intratecal de mitocôndrias. Ainda, houveram prejuízos mitocondriais na eficiência do sistema de transporte de elétrons (STE) respirometria acoplada a síntese de ATP, nas dinâmicas do potencial de membrana e no efluxo de Ca²⁺ tanto nas porções proximais e caudais da medula. Estas alterações foram revertidas na região caudal e atenuadas na porção proximal após o transplante de mitocôndrias. A produção de H₂O₂ mitocondrial foi elevada no grupo CR porem revertida a níveis do controle no grupo CR-MIT, no grupo MIT houve uma diminuição da produção de peróxido de hidrogênio quando comparado com CT. O aumento de TOM20 e PGC1 α indica um aumento do conteúdo mitocondrial nos grupos transplantados. A atividade das desidrogenases mitocondriais estavam diminuídas nas três regiões cerebrais (CX, HC e HT) e no terço proximal da medula, esse prejuízo foi revertido na medula pelo transplante mitocondrial. Encontramos um aumento nos biomarcadores de neurodegeneração (pTAU^{ser396}/TAU, clivagem de α -espectrina e clivagem de Caspase 3) no cérebro (CX, HC e HT) e nas duas porções medulares, na medula o tratamento foi capaz de reverter essa condição.

Dessa forma CR propagam alterações bioenergéticas mitocondriais ao longo de toda a extensão da medula espinhal o que representa um mecanismo patofisiológico associado aos prejuízos neurológicos. O transplante mitocondrial, melhorou o perfil bioenergético e reverteu os prejuízos neurológicos sugerindo uma integração das mitocôndrias na medula espinhal. Estes resultados colocam a atividade bioenergética mitocondrial como um componente central envolvido na recuperação motora após CR.

Palavras-chave: Concussões repetidas. Bioenergética. Transplante mitocondrial. Lesão axonal. Neurodegeneração.

ABSTRACT

Repeated concussion (RC) is strongly associated with chronic traumatic encephalopathy. In this condition, a classical find is the diffuse axonal degeneration, which is characterized by proteins aggregation, mitochondrial dysfunction, and neurodegeneration. Frequently, former athletes who suffered from RC presents, besides the neuropsychological symptoms, decreased motor capacity, balance problems, loss of coordination and strength in the limbs, suggesting a possible expansion of primary brain damage to the spinal cord. However, this issue has been poorly explored related to the interplay between RC and spinal cord degeneration. In this study we aimed to investigate whether the CR propagated mitochondrial bioenergetic changes and axonal degeneration from the brain to the spinal cord, and thus propose an innovative mitochondrial transplant-based therapy.

CF1 male mice, 90-days years old were subjected to 3 concussions (with 72h interval between each one). Biomechanical parameters for the cortical impact (CCI) were: depth: 5 mm, velocity, 5.7 m /sec; and length of stay on site, 0.1sec. After 24 hours, the animals received an intrathecal injection of 5 μ L of saline or mitochondria isolated from the cerebral cortex, resulting in groups: control (CT), mitochondrial transplantation (MIT), repeated concussion (RC) and RC-MIT, (n = 12 animals per group). Twenty-four hours after mitochondrial transplantation the animals underwent motor tests such as open field (OF), cylinder test, beam walk (BW); and upper limb strength (grip strength, GS). Biochemical analyzes of mitochondrial activity and protein biomarkers were performed on mitochondria isolated from the proximal and caudal portions of the spinal cord, and in homogenates from the cortex (CX), hippocampus (HC) and hypothalamus (HT).

The animals submitted to CR presented a decreased strength in the upper limbs symmetric coordination and balance (GS, cylinder test and BW) which was reversed by the intrathecal mitochondrial transplantation. Furthermore, there were impairments in the mitochondrial Ca^{2+} efflux mediated for NCLX, membrane potential dynamics, electron Transport system (ETS) efficiency and ATP synthesis-coupled respirometry, in both the proximal and caudal portions of the medulla. These abnormalities were reversed in the caudal region and attenuated in the proximal portion after mitochondrial transplantation. The rise in mitochondrial H_2O_2 production in the RC group was reversed to control levels in the MIT-RC group and decreased in the MIT when compared to the CT group. The increase in TOM20 and PGC1 α indicates an increase in mitochondrial content in the transplanted groups. Mitochondrial dehydrogenase activity was decreased in the brain regions (CX, HC, HT), and in the proximal spinal cord. All deficits were restored after the mitochondrial transplantation. Neurodegeneration biomarkers (pTAU^{ser396}/TAU, cleaved α -spectrin and cleaved Caspase-3) were increased in all three brain regions and in both portions of the medulla. Mitochondrial transplantation was able to reverse these alterations in the spinal cord of the RC-MIT group relative to CT.

Repeated concussions propagate neurodegenerative signaling likely through mitochondrial bioenergetic alterations from the brain to along the entire length of the spinal cord. This may represent a pathophysiological mechanism associated with neurological damage. Mitochondrial transplantation improved the bioenergetic profile and reversed neurological impairments suggesting an integration of mitochondria in the spinal cord. These results place mitochondrial bioenergetics activity as a pivotal component involved in motor recovery after CR.

Keywords: Repeated concussions. Mitochondrial transplantation. Bioenergetics. Axonal degeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Causas de TCE.....	8
Figura 2 – Epidemiologia do TCE.....	9
Figura 3 – Fluxograma dos mecanismos fisiopatológicos.....	10
Figura 4 – Desestruturação axonal.....	11
Figura 5 – Dano mitocondrial.....	12

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BW	Beam Walk
CA	Campo Aberto
CCI	Controlled Cortical Impact
CR	Concussões repetidas
CX	Córtex
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECGI	Escala de Coma de Glasgow
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies Reativas de oxigênio
ETC	Encefalopatia Traumática crônica
ETS	Electron Transport System
GS	Grip Strenght
HC	Hipocampo
HT	Hipotálamo
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
NCLX	Mitochondrial sodium-calcium exchanger
OF	Open Field
RC	Repeated Concussion
STE	Sistema de Transporte de Elétrons
TCE	Traumatismo Crânio Encefálico
TC	Teste do Cilindro
TD	Terço distal
TP	Terço proximal

SUMÁRIO

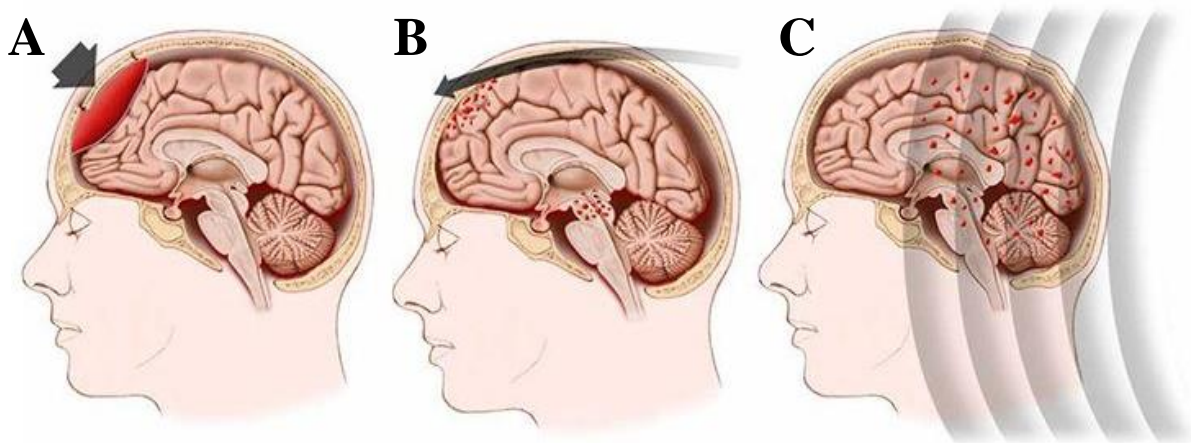
1	INTRODUÇÃO	8
1.1	JUSTIFICATIVA	16
1.2	OBJETIVOS.....	17
1.2.1	Objetivo geral	17
1.2.2	Objetivos específicos	17
2	ARTIGO CIENTÍFICO	18
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO A – Normas de publicação da revista – Journal of Neurotrauma	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia Trauma Cranioencefálico (TCE)

O trauma cranioencefálico (TCE) é, por definição, a alteração da função normal cerebral decorrente de forças biomecânicas externas, que podem se originar de um impacto direto ao crânio, aceleração e desaceleração rotacional abrupta da cabeça, ou proveniente de ondas de choque causadas pelo deslocamento do ar. Pode haver ou não de penetração da caixa craniana por objetos ou somente rachaduras. As causas mais frequentes de TCE no mundo são quedas, acidentes veiculares, prática de esportes, violência, penetração de projéteis ou de objetos no cérebro (BLENNOW; HARDY; ZETTERBERG, 2012; ROSENFELD; MAAS; BRAGGE; MORGANTI-KOSSMANN *et al.*, 2012).

Figura 1. Causas de TCE.

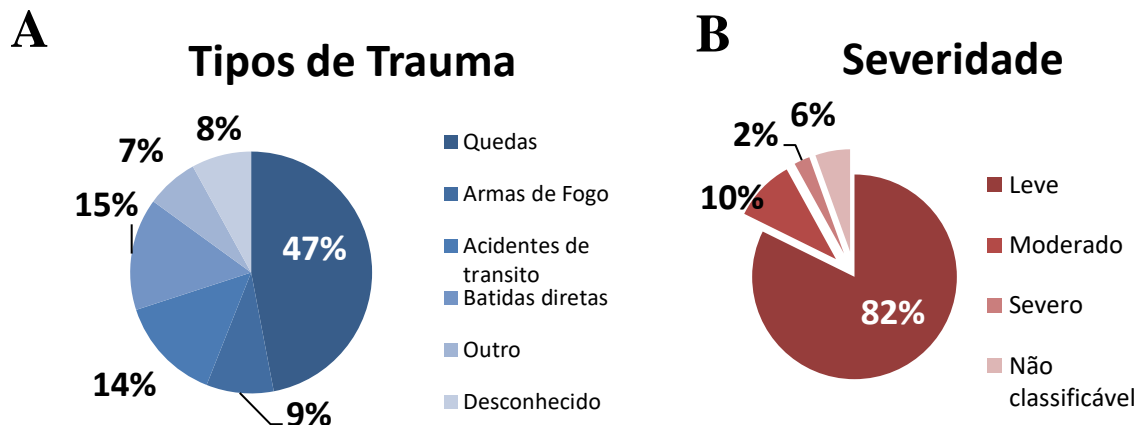


Fonte: Dawudo ST et all. Medscape. Aug 16. 2017. (A) Impacto direto. (B) Aceleração e desaceleração. (C) Ondas de Choque.

De acordo com a gravidade, o TCE é classificado como leve, moderado e grave, sendo a Escala de Coma de Glasgow (ECGI) a principal métrica para avaliação deste parâmetro neurológico, pois ele determina o nível de consciência do paciente. Dentre os desfechos mais associados ao TCE estão a morte prematura, alterações cognitivas e neuropsiquiátricas e sequelas físicas que podem comprometer, muitas vezes, a qualidade de vida dos indivíduos sobreviventes (LEVIN; DIAZ-ARRASTIA, 2015; MEANEY; MORRISON; DALE BASS, 2014). Os TCEs leve ou moderado, também chamado de concussões, são o tipo de trauma

mais comum e frequentemente estão associados a prática de esportes profissionais ou recreacionais que envolvem contato físico como futebol americano, rugby e lutas. Os sintomas mais comuns que sugerem que um indivíduo sofreu uma concussão são a perda de consciência, amnésia, dor de cabeça, tonturas, visão embaçada, hipersensibilidade auditiva e visual, convulsões e confusão mental. Sabe-se que concussões repetidas (CR) estão associadas com o desenvolvimento da encefalopatia traumática crônica (ETC), uma condição que está mecanisticamente associada a degeneração axonal, prejuízos neuropsicológicos e motores a curto e longo prazo (DANESHVAR; GOLDSTEIN; KIERNAN; STEIN *et al.*, 2015).

Figura 2. Epidemiologia do TCE.



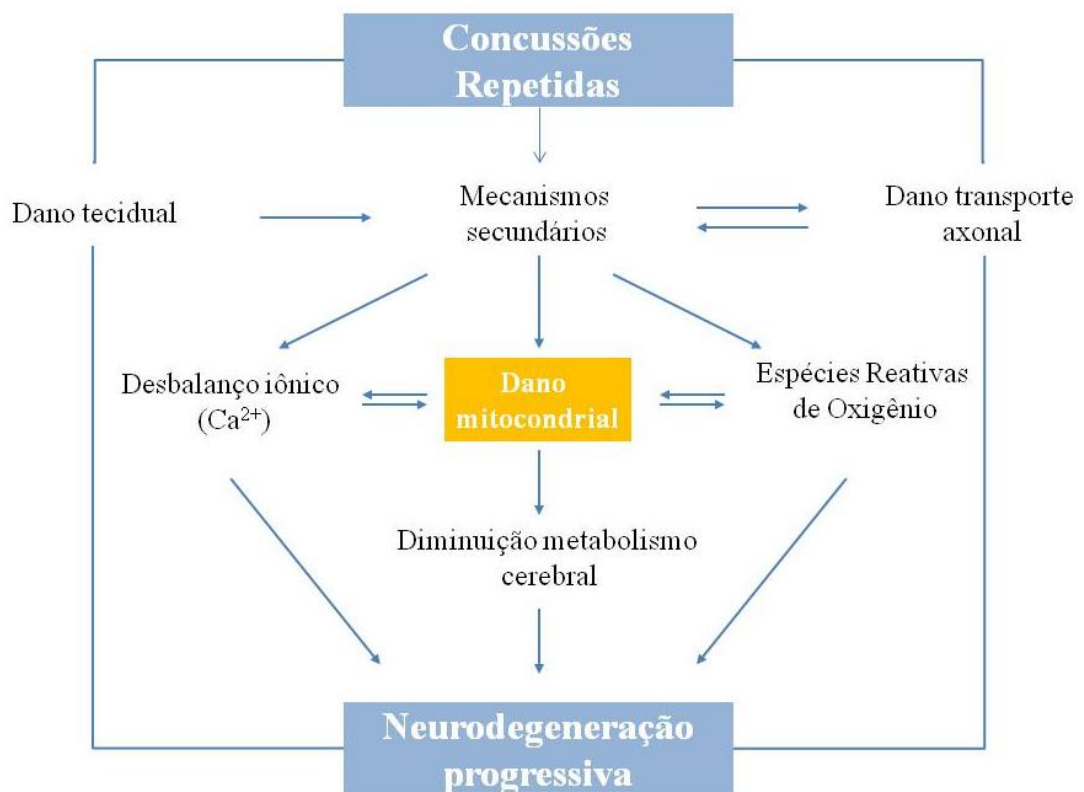
Fonte: elaborada pelo autor. (A) Tipos de TCE. (B) Severidade do TCE.

1.2 Mecanismos fisiopatológicos associados a CR

Os mecanismos fisiopatológicos associados as CR envolvem a lesão primária resultante do dano físico à massa cerebral rompimento de células e de vasos sanguíneos, levando a liberação do conteúdo intracelular para o meio extracelular gerando um ambiente citotóxico para as células adjacentes. O dano secundário envolve alterações bioquímicas e proteicas que levam a propagação o dano primário. Particularmente ocorre um processo denominado lesão axonal difusa cujos mecanismos envolvem a desestruturação do citoesqueleto neuronal pela desorganização dos microtúbulos, devido à hiperfosforilação da proteína Tau, o rompimento da rede de filamentos de actina por conta da clivagem da α -espectrina (DASH; ZHAO; HERGENROEDER; MOORE, 2010; ROOZENBEEK; MAAS; MENON, 2013), e também pela ruptura dos neurofilamentos neuronais. A desestruturação das proteínas do citoesqueleto pode levar a morte neuronal imediata ou alternativamente ativar

processos neurodegenerativos de longo prazo (KAUR; SHARMA, 2018). Neste último caso, formações específicas decorrentes da lesão inicial no axônio denominadas de “bulbos axonais” passam a ser determinantes da vida ou morte dos neurônios via degeneração, pois acabam por diminuir ou cessar o fluxo de moléculas e organelas do interior do axônio (JOHNSON; STEWART; SMITH, 2013).

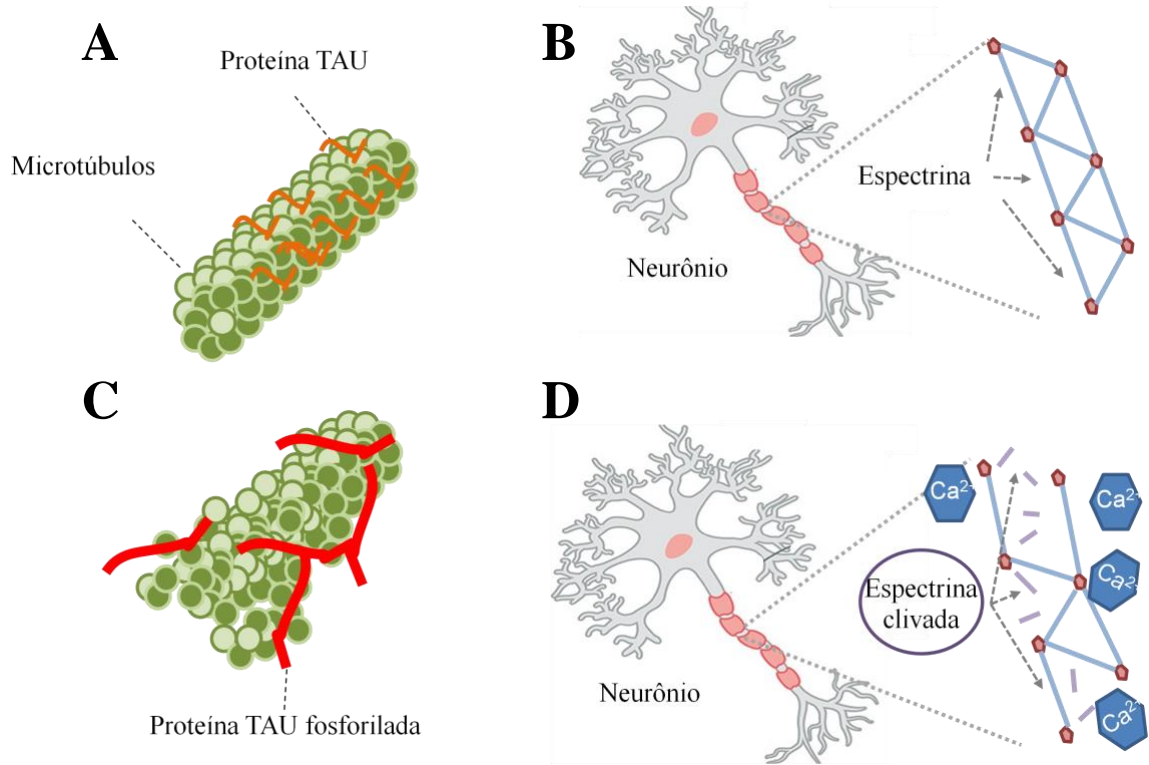
Figura 3. Fluxograma dos mecanismos fisiopatológicos do TCE.



Fonte: elaborada pelo autor.

A lesão axonal difusa evidenciada pela ruptura dos feixes axonais, formação dos bulbos e varicoses causa prejuízo ao transporte axonal pós TCE. Isso leva a ativação persistente de uma complexa rede de cascatas neuroquímicas que acabam desencadeando a perda de conectividade neuronal, diminuição do metabolismo mitocondrial e a ativação de efetores de morte de células neurais adjacentes ao foco da lesão, ou mais importante ainda, propagam o dano a partir do foco inicial (JOHNSON; STEWART; ARENA; SMITH, 2017; ROOZENBEEK; MAAS; MENON, 2013).

Figura 4. Desestruturação axonal.

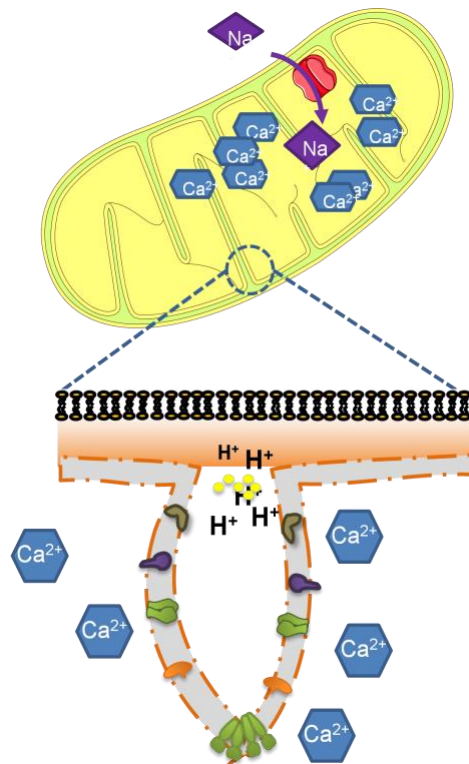


Fonte: elaborada pelo autor. (A e B) Estabilizadores de proteínas do citoesqueleto axonal. (C e D) Desestruturação do citoesqueleto axonal causado por concussões.

Além do transporte axonal deficiente, os processos bioquímicos desencadeados pelo dano primário causam o desbalanço iônico intracelular levando a aumento nas concentrações de Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , por exemplo (CONTRERAS; DRAGO; ZAMPESE; POZZAN, 2010; SUN; CHEN; GU; WANG *et al.*, 2017). O cátion mais estudado e associado ao dano secundário pós TCE é o cálcio que está diretamente relacionado a inúmeros processos celulares como funcionamento do retículo endoplasmático rugoso, processos autofágicos e principalmente, no caso do TCE, com a função bioenergética mitocondrial. Fisiologicamente, a mitocôndria capta cálcio citosólico, o qual exerce uma atividade reguladora da atividade mitocondrial (AGARWAL; WU; HUGHES; FUKAYA *et al.*, 2017); todavia no TCE causa um aumento excessivo de cálcio intra mitocondrial o que aparentemente gera complicações metabólicas e funcionais para as células. É preciso levar em conta que o equilíbrio do cálcio

intramitocondrial é dinâmico e precisa se adaptar a atividade da membrana plasmática. Neste sentido, o efetor principal da saída de cálcio mitocondrial, o transportador NCLX, realiza a troca de 3 íons Na^+ pelo efluxo de 1 íon Ca^{2+} (LUONGO; LAMBERT; GROSS; NWOKEDI *et al.*, 2017). O inchaço mitocondrial devido ao excesso de cálcio leva a formação de poros de transição no interior da membrana interna mitocondrial, e a alterações na capacidade de manter os prótons (H^+) no espaço inter membrana. De maneira geral, isso afeta a competência da mitocôndria em formar e dissipar seu potencial eletroquímico e sua capacidade de integrar diferentes funções celulares incluindo a produção de ATP (CARTERI; KOPCZYNSKI; RODOLPHI; STROGULSKI *et al.*, 2019).

Figura 5. Dano mitocondrial.



Fonte: elaborada pelo autor. Acúmulo de cálcio no interior da mitocôndria por atividade deficiente do transportador NCLX realizar o efluxo de cálcio em troca com o sódio. Formação de poros na membrana interna da mitocôndria e extravasamento de prótons H^+ .

O acúmulo de íons carregados no interior das células forma um ambiente favorável para o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ZOROV; JUHASZOVA; SOLLITT, 2014). Particularmente a produção exacerbada de peróxidos de hidrogênio mitocondrial e do ânion superóxido contribuem para o processo neurodegenerativo

que segue ao TCE. Além disso, o aumento de ERO serve como um *feedback* positivo para o dano mitocondrial (SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Alterações mitocondriais causadas pelas concussões também se refletem em prejuízos na neuroenergética, o que sugere que os componentes da maquinaria bioenergética mitocondrial não estão trabalhando de maneira orquestrada com a demanda energética ou estão deficientes (FISCHER; HYLIN; ZHAO; MOORE *et al.*, 2016). Desta maneira, a capacidade de transportar elétrons entre os complexos respiratórios, o potencial eletroquímico, a influência individual dos complexos no processo global de produção de ATP passam a ser alvo de interesse, uma vez que a deficiência energética conduz as células para um caminho de neurodegeneração apoptótica (DANESHVAR; GOLDSTEIN; KIERNAN; STEIN *et al.*, 2015; JOHNSON; STEWART; ARENA; SMITH, 2017). A diminuição da capacidade fosforilativa da mitocôndria é o principal marcador da bioenergética, sendo assim um mecanismo que precisa ser melhor explorado nas concussões uma vez que não se conhece totalmente como ele poderia ser modulado pelos sistemas de neurotransmissão, e sinalização por íons e hormônios.

Ocorre também, devido ao prejuízo bioenergético e a ruptura das membranas celulares gerando sinalizações de proteínas associadas com a morte programada da célula tais como aumento de BAX mitocondrial e BCL2 citosólica que culminam em uma maior liberação de Citocromo-c pelas mitocôndrias, que é um ativador da via apoptótica intrínseca à caspase, gerando no final acúmulo de Caspase3-clivada (LORENTE; MARTIN; ARGUESO; RAMOS *et al.*, 2015; SINGH; PUSHKER; SAINI; SEN *et al.*, 2015; WALENSKY, 2019). Assim, as respostas celulares adaptativas, como por exemplo, relacionadas a capacidade de sentir a demanda energética e prover energia através da síntese mitocondrial de ATP, são parte fundamental na manutenção de todos os processos celulares. Desta maneira, as mitocôndrias parecem ser um ponto de integração de todas as funções e compartimentos celulares dependentes de energia e do cálcio. Podemos inferir que estes aspectos neuroenergéticos apesar de relevantes para a sobrevivência celular têm sido pouco explorados (PFANNER; WARSCHEID; WIEDEMANN, 2019).

O entendimento dos processos fisiopatológicos das concussões é de extrema importância para propor estratégias que visem combater o desenvolvimento do dano secundário e as alterações neurológicas a longo prazo (IVERSON; GARDNER; TERRY; PONSFORD *et al.*, 2017; LAWRENCE; HUTCHISON, 2017). Entretanto as evidências que

indiquem se há alterações expansivas com relação ao local de origem do impacto ainda são escassas. Um aspecto intrigante é que a perda de mobilidade tardiamente após CR é relativamente comum em atletas, mesmo sem haver impactos diretamente na medula espinhal ou pernas, e mesmo que não venham a desenvolver a ETC. Ainda, os danos motores devido a CR quando não há dano direto na medula espinhal indicam que a lesão axonal difusa progride do cérebro para a medula espinhal.

Assim, torna-se relevante investigar se o impacto gerado ao cérebro pelas CR propaga modificações funcionais e estruturais nos axônios da medula espinhal através de mitocondriais disfuncionais.

1.3 Tratamentos para CR

Um aspecto fundamental da patologia axonal pós CR é que o conhecimento dos mecanismos bioquímicos é escasso e por isso as intervenções terapêuticas são limitadas e pouco efetivas (LAWRENCE; HUTCHISON, 2017). Para pessoas que sofrem uma concussão, principalmente atletas, existe hoje em dia “protocolo de concussão” que consistem em avaliar a severidade do TCE e a presença de sintomas. O repouso é proposto como uma intervenção para auxiliar na recuperação embora existam controvérsias sobre sua efetividade. As opções farmacológicas para manipulação das concussões são escassas e não existe uma grande evolução nas últimas duas décadas (LAWRENCE; HUTCHISON, 2017).

Atualmente, tem se buscado o reposicionamento de drogas, como anabólicos esteroides, mas embora os modelos pré-clínicos tenham mostrado bons resultados, ainda não se obteve resultados robustos que favoreçam a essa utilização em pacientes. Ainda, intervenções dietéticas vem sendo utilizadas tentando uma recuperação acelerada (EL-HATTAB; ZARANTE; ALMANNAI; SCAGLIA, 2017; WINKLER; MINTER; YUE; MANLEY, 2016).

Devido o papel central desempenhado pela mitocôndria nos processos degenerativos, ocasionado pelo TCE, tem-se utilizado drogas tendo como alvo terapêutico a mitocôndria, tanto para induzir a expressão de PGC1 α , que é o principal fator de transcrição para biogênese quanto para melhorar à eficiência fosforilativa mitocondrial (HIRANO; EMMANUELE; QUINZII, 2018; KEHREIN; BONNEFOY; OTT, 2013). Entretanto por conta das diferenças existentes na metabolização dos fármacos nos roedores e nos pacientes, ainda não se obteve

um tratamento satisfatório para tratar a disfunção da mitocôndria, em pacientes acometidos por TCE.

O tratamento com o transplante de células e organelas vem sendo testado em diferentes tipos de patologias(BEN-SHACHAR; ENE, 2018; EMANI; PIEKARSKI; HARRILD; DEL NIDO *et al.*, 2017; SHIN; COWAN; EMANI; DEL NIDO *et al.*, 2017). O processo consiste em injetar no paciente, novas células com o intuito de que elas se integrem no microambiente celular e combatam a patologia em questão, essa abordagem vem demonstrando promissores resultados já na clínica. Visto as dificuldades de encontrar fármacos que consigam modular benéficamente as mitocôndrias de um paciente acometido por CR, sugerimos a utilização de mitocôndrias isoladas saudáveis, para tentar induzir um aumento do número total de mitocôndrias, bem como estimular a biogênese mitocondrial e suprir as demandas energéticas das células acometidas pelas CR.

2 JUSTIFICATIVA

O TCE está associado com grandes despesas de gastos públicos, não apenas durante o tratamento hospitalar, mas também na alta dos pacientes devido aos custos pela ausência no trabalho ou mesmo incapacidades de indivíduos em idade produtiva. Considerando a relação existente entre pacientes que foram acometidos por CR ao longo da vida e as perdas motoras, existem evidências para associação na perda da qualidade de vida devido a uma possível neurodegeneração expansiva para a medula causada por concussões. Como foi relatado anteriormente a farmacologia para manejo de pacientes é limitada. Aqui, propomos o transplante de mitocôndrias, uma organela que está associada intimamente com processos de sobrevivência, como um possível tratamento para evitar danos secundários axonais progressivos associados ao TCE.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar se CR são capazes de propagar a degeneração para a medula espinhal e propor o transplante de mitocôndrias como uma estratégia inovadora para o tratamento dessa condição.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar se a neurodegeneração se estende do cérebro para a medula espinhal;
- b) Avaliar proteínas do citoesqueleto axonal;
- c) Investigar o conteúdo de proteínas relacionadas a neurodegeneração medular;
- d) Avaliar a atividade bioenergética de mitocôndrias de diferentes secções da medula espinhal;
- e) Caracterizar a viabilidade do transplante de mitocôndrias;
- f) Avaliar o potencial terapêutico do transplante de mitocôndrias na neuroenergética da medula espinhal e nas respostas locomotoras.

**4 ARTIGO CIENTÍFICO – Redigido conforme as normas de publicação do periódico
“Journal of Neurotrauma”**

**Transplante mitocondrial melhora as respostas locomotoras e bioquímicas medulares
após concussões repetidas**

Afonso Kopczynski¹, Wesley Cotta dos Santos, Nathan Ryzewski Strogulski, *MSc.*¹
Marcelo Salimen Rodolphi *MSc.*¹, Pedro Henrique da Rosa Correa ¹, Antonio Galina,
*PhD*², Douglas H. Smith³, *MD*, Luis Valmor Portela, *PhD*^{1*}

1. Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores - Departamento de Bioquímica, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil.
3. Penn Center for Brain Injury and Repair and Department of Neurosurgery, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.

Correspondence:

* Dr. Luis V. Portela,

Department of Biochemistry,

ICBS, UFRGS. Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: 55 51 33085558; Fax: 55 51 33085544;

E-mail: roskaportela@gmail.com

Introdução

O traumatismo crânio encefálico (TCE) é reconhecida como um problema de saúde pública por todo o globo (FAUL; CORONADO, 2015; LANGLOIS; RUTLAND-BROWN; WALD, 2006). A patofisiologia se dá primariamente pelo dano mecânico infringido ao cérebro que desencadeia diferentes cascatas bioquímicas resultando em uma propagação do dano, conhecido como mecanismo secundário (JASSAM; IZZY; WHALEN; MCGAVERN *et al.*, 2017). Porém os mecanismos moleculares envolvidos nessa propagação ainda não estão bem esclarecidos, embora se saiba que a atividade bioenergética mitocondrial está diminuída (HIEBERT; SHEN; THIMMESCH; PIERCE, 2015; KULBE; HILL; SINGH; WANG *et al.*, 2017; SUN; CHEN; GU; WANG *et al.*, 2017).

Dentre os tipos de TCE os mais prevalentes estão os traumas leves e moderados, sendo as concussões o tipo mais comum (KAMINS; GIZA, 2016). É estabelecido que repetidas concussões (CR) ao longo da vida estão associadas com o desenvolvimento da encefalopatia traumática crônica (CHOE, 2016; KULBE; HALL, 2017), condição ainda mais frequente em ex atletas de esportes de contato (MANLEY; GARDNER; SCHNEIDER; GUSKIEWICZ *et al.*, 2017). As concussões são relacionadas com a lesão axonal difusa que tem como característica a desestruturação das proteínas de citoesqueleto axonal como os microtúbulos por conta da hiperfosforilação da proteína TAU e a clivagem de α -espectrina, que atua como estabilizadora da rede de actina (CARTERI; KOPCZYNSKI; MENEGASSI; SALIMEN RODOLPHI *et al.*, 2019; KULBE; HALL, 2017; WANG; YANG; ZHU; SHI *et al.*, 2018). Por conta da desestruturação axonal ocorre um aumento da sinalização pro apoptótica caspase dependente, associado a um aumento da concentração de BAX mitocondrial e BCL2 citosólica. Estas alterações culminam no extravasamento de citocromo-C da mitocôndria para o citosol que acaba por ativar clivagem de caspase 3 gerando a morte celular (BRENTNALL; RODRIGUEZ-MENOCAL; DE GUEVARA; CEPERO *et al.*, 2013; DU, 2016; GLUSHAKOVA; GLUSHAKOV; BORLONGAN; VALADKA *et al.*, 2018; QIU; SHI; ZHUANG; ZHANG *et al.*, 2017).

As concussões também são relacionadas com déficits no metabolismo bioenergético mitocondrial e com maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FRATI; CERRETANI; FIASCHI; FRATI *et al.*, 2017), pois acarretam em um desbalanço iônico que perturba o funcionamento mitocondrial, como por exemplo, devido ao excesso de Ca^{2+} (SUN;

DESHPANDE; SOMBATI; BARANOVA *et al.*, 2008). Por conta do desbalanço iônico ocorre diminuição da capacidade mitocondrial de transportar elétrons e de fosforilar ADP, acarretando em uma diminuição da eficiência bioquímica(HIEBERT; SHEN; THIMMESCH; PIERCE, 2015; NAVIAUX, 2014). Os danos mitocondriais aparentemente sustentam os processos de neurodegeneração. Embora esses processos estão bem estabelecidos para a neurodegeneração cerebral, não existem evidências que liguem este dano secundário e degeneração da medula.

É relatado que ex atletas e pacientes que foram acometidos por concussões apresentam perda de mobilidade, força e equilíbrio mesmo na ausência de traumatismo raquimedular (TRM), o que poderia sugerir uma propagação do dano cerebral para a medula espinhal(MANLEY; GARDNER; SCHNEIDER; GUSKIEWICZ *et al.*, 2017; REFAKIS; TURNER; CAHILL, 2017; STEENERSON; STARLING, 2017). A comunicação dos efeitos deletérios do TCE para a medula apenas foi explorada em pacientes poli trauma o que limita a localização da região específica da injúria inicial e sua relação com outros órgãos(BOMBARDIER; LEE; TAN; BARBER *et al.*, 2016). As principais patologias relacionadas com a perda de mobilidade por degeneração progressiva da medula estão relacionadas, também, com prejuízos na atividade mitocondrial(CHOE, 2016; FRATI; CERRETANI; FIASCHI; FRATI *et al.*, 2017; JOHNSON; STEWART; SMITH, 2013). Desta maneira a mitocôndria pode ser considerada um componente crucial da sobrevivência e morte por degeneração apoptótica.

Por conta de danos mitocôndrias estarem relacionados com a neurodegeneração progressiva, tanto cerebral quanto medular, tem sido proposta a utilização de drogas que tenham a mitocôndria como um alvo terapêutico em modelos pré-clínicos(LAMADE; KENNY; ANTHONYMUTHU; SOYSAL *et al.*, 2019; SHARMA; LIAW; SHARMA; ZHANG *et al.*, 2018; WANG; YANG; ZHU; SHI *et al.*, 2018). Os resultados promissores têm demonstrando que estimular as mitocôndrias de animais submetidos ao TCE, geram respostas neuroprotetoras. Porém, a translação dos modelos animais para os pacientes tem carecido de mais evidências.

No presente estudo objetivamos estabelecer um elo funcional entre os danos cerebrais proveniente das CR com possíveis prejuízos na medula espinhal. Propomos também uma estratégia inovadora que converge com as teorias de terapia mitocondrial. Hipotetizamos que

o transplante de mitocôndrias viáveis e que não sofreram um TCE, pode ser relevante para o tratamento dos danos causados pelas concussões.

Materiais e Métodos

Animais e tratamento

Camundongos CF1 de 90 dias de idade (n total de 50 animais) divididos em 4 grupos, controle (CT, n = 12), transplante de mitocôndria (Mit, n = 12), concussões repetidas (CR, n = 12) e CR-MIT (n = 12), o cérebro de dois animais foram utilizados para realizar o isolamento de mitocôndrias para o posterior transplante. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS e ficaram em ambiente com temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$), ciclo claro e escuro de 12h, com livre acesso a comida e água. Animais foram tratados 24 horas após a indução da última concussão com 5 μL de salina ou 5 μL de mitocôndrias isoladas, a injeção foi feita via intratecal no terço distal da medula espinhal (MCCULLY; COWAN; EMANI; DEL NIDO, 2017). Dois dias após a injeção os animais foram eutanasiados, foi dissecado o córtex (CX), hipocampo (HC) e hipotálamo (HT) para a caracterização do modelo de concussão. Os terços proximais (TP) e distais (TD) da medula espinhal foram dissecados para análises estruturais e bioquímicas (figura 1 A). Todos os experimentos do trabalho seguiram as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais, UFRGS, Brasil número 33764.

Indução do TCE

Para gerar as concussões, foi utilizado o equipamento myNeuroLab®, Leica, St. Louis, MO, USA. O trauma mimetizou as concussões sofridas a partir de quedas ou esportes de contato. Os animais foram previamente anestesiados com isoflurano 3% afim de ficarem sedados para o procedimento. Após foram colocados no estereotáxico para que sua cabeça ficasse posicionada para receber o impacto que teve como parâmetros uma velocidade de 5,7 m/s, uma profundidade anteroposterior de 5 mm e um tempo de permanência de 0,1s no local do insulto. Foram realizados três traumas com intervalo de 72h entre cada concussão. Os grupos CR e MIT apenas passaram pelo mesmo procedimento de anestesia e alocação no estereotáxico. Posteriormente os animais ficaram repousando em colchão com aquecimento

até recobrem a consciência para retornarem as suas caixas (MA; SMITH; DESAI; CHEUNG *et al.*, 2017).

Teste de Campo Aberto

O teste do campo aberto foi realizado para avaliar possíveis danos das concussões no perfil exploratório e locomotor dos animais. O aparato é uma arena de madeira medindo 60 cm de diâmetro cercada por paredes de 50 cm de altura. Inicialmente o animal foi habituado a sala durante 30 min, com temperatura 37°C e luminosidade controlados. O aparato foi subdividido em duas áreas, centro e periferia, foi avaliado o tempo de permanência em cada subárea, tempo imóvel, distancia percorrida total e velocidade média. Os testes foram filmados com duração de 10 minutos e foram analisados com utilização do software *Anymaze* ® (ZIMMER; TORREZ; KALININE; AUGUSTIN *et al.*, 2015).

Teste de força

O teste de *grip strength* foi realizado para avaliar a capacidade da força física dos membros dianteiros dos camundongos. Foi utilizado ao equipamento EFF 305 da Insight ®, 24 horas após o transplante de mitocôndrias, os animais foram posicionados de forma que suas patas dianteiras segurassem em uma barra metálica do aparelho, ao estarem bem fixos foram puxados pela cauda até se soltarem do equipamento. O teste foi realizado duas vezes em cada animal. Os resultados foram expressos por kg força (MONTILLA-GARCIA; TEJADA; PERAZZOLI; ENTRENA *et al.*, 2017).

Teste de coordenação motora

O teste do cilindro foi realizado para testar a simetria do movimento dos animais. O teste consiste em avaliar o número de toques que o animal realizou com os membros superiores em uma superfície durante 5 minutos. O animal passou por 30 minutos de habituação com temperatura e luminosidades controladas, para se acostumar com o ambiente para realização do teste, após esse período foi colocado em um cilindro de vidro onde foi filmado para posterior quantificação dos toques com a pata direita, esquerda ou ambas. Para expressar os dados foi realizado um índice que leva em consideração o numero de toques por patas individuais ou ambas as patas simultaneamente. Os testes foram gravados para posterior quantificação. (ROOME; VANDERLUIT, 2015).

Teste de equilíbrio

O teste de equilíbrio, *beam balance*, foi realizado para avaliar a motricidade fina. O teste foi realizado 24 horas após o tratamento. O animal foi habituado ao ambiente por 30 min mantendo a temperatura e luminosidade da sala constantes. Os animais foram, então, posicionados em uma plataforma elevada e uma luz incandescente foi colocada próxima a eles com intuito de criar um ambiente aversivo, a plataforma era ligada diretamente a caixa-casa do animal por um cilindro fêrrico de 2 mm de espessura, a caixa posicionada a uma inclinação inferior à plataforma. Foi avaliado o tempo de latência para o animal retornar a sua caixa e quantos erros de passada (*foot faults*) o animal comete ao percorrer o caminho. Os testes tiveram duração máxima de 5 minutos e foram gravados para posterior quantificação (CARTER; MORTON; DUNNETT, 2001).

Fracionamento celular

O protocolo de fracionamento celular utilizando de gradientes de Percoll® com intuito de obter um preparado mitocondrial purificado, foi realizado adaptação do protocolo de Sims e Anderson, (SIMS; ANDERSON, 2008). O isolamento de mitocôndrias foi realizados em tecidos rapidamente homogeneizados após sua dissecação em uma solução tampão contendo 320mM de Sacarose, 1 mM de EDTA (K⁺) e 10mM de TRIS (pH 7.4), o homogeneizado foi submetido a centrifugação de 1330xg por 3 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 21200xg por 10 minutos, o pellet resultante transferido para um gradiente descontínuo de Percoll® (15, 23 e 40%), a fração purificada de mitocôndrias foi extraída e passou por um processo de lavagem para retirar o Percoll® sendo centrifugada a 16500xg por 10 minutos, o pellet foi ressuspendido e novamente centrifugado a 6900xg por 10 minutos, o pellet resultante foi ressuspendido em 500 µL de uma solução tampão contendo 320mM de Sacarose e 10mM de Tris (pH 7.4). A partir do cérebro de dois camundongos *naive*, foram isoladas mitocôndrias para posterior transplante mesmo protocolo foi utilizado para realizar o isolamento de mitocôndrias provenientes da dissecação dos terços proximal e distal medula espinhal, dos animais, para realização das análises do painel bioenergético. (MULLER; HAAS; CAMACHO-PEREIRA; BROCHIER *et al.*, 2013).

Painel mitocondrial

Foi utilizado o ensaio de formação de MTT formazan em homogeneizados das estruturas cerebrais (córtex, hipocampo e hipotálamo) e no isolado mitocondrial dos terços

proximal e distal da medula espinhal para avaliar a atividade das desidrogenases mitocondriais. As amostras foram incubadas com 0,5 mg/ml de MTT a 37°C por 45 minutos o produto de formazan formado durante o processo foi solubilizado em DMSO e a absorbância dessa solução foi medida à 560 e 630nm em espectrofotômetro (Spectra Max M5, Molecular Devices).(PORTELA; GNOATTO; BROCHIER; HAAS *et al.*, 2015)

Para avaliação do perfil bioenergético do isolado mitocondrial das mitocôndrias que foram transplantadas (dado não apresentado) e dos terços medulares foi realizado a respirometria de alta resolução em tempo real (Oroboros O2k-oxygraph, Áustria). Foi utilizado um protocolo com substratos, desacopladores e inibidores (SDI) do sistema de transporte de elétrons (STE). As análises foram realizadas em uma solução tampão contendo (100mM KCl, 100mM manitol, 5mM fosfato, 0.05mM EDTA e 10mM Tris-HCl, pH 7.4). Os resultados foram normalizados por conteúdo de proteínas. Todas as análises foram realizadas em cubas de 2mL vedadas, à constantes 37°C. Após 10 minutos de estabilização da amostra no aparelho, foram adicionados 4,0mM de Piruvato, Malato e Glutamato (PMG), após estabilização (R) foi utilizado 2,5mM de ADP, seguido a sua estabilização foi adicionado 2mM de Succinato e novamente 2,5mM de ADP. Após a estabilização da máxima capacidade fosforilativa (P), foi adicionado um inibidor da FoF1 ATP sintase, oligomicina (2ug) com objetivo de obter as respiração não fosforilativa (L_{omy}). Foi então utilizado um ionóforo permeabilizador de membrana, CCCP (0,1mM), para abrir poros na membrana interna mitocondrial e avaliar a capacidade máxima do STE (E). Foram adicionados inibidores do complexo I (Rotenona, 2mM), complexo II (Malonato), complexo III (Antimicina-A) e complexo IV (Azida Sódica) para avaliar o consumo de O_2 , especificamente por complexo. Foram calculados a partir dos resultados obtidos: o fluxo de consumo de oxigênio por complexo (FCF CI, FCF CII), a eficiência bioquímica mitocondrial, a capacidade do STE, o extravasamento de prótons H^+ . (CARTERI; KOPCZYNSKI; RODOLPHI; STROGULSKI *et al.*, 2019)

Avaliamos o manejo do fluxo de Ca^{2+} mitocondrial induzindo ao seu influxo e efluxo pela mitocôndria, 50 μ L de amostra do isolado de mitocôndrias dos dois terços medulares foram incubados com tampão de *swelling* (100mM KCl, 50mM Sacarose, 10mM HEPES e 5 mM KH_2PO_4). Foi realizada a estabilização da amostra monitorando sua absorbância por 3 min, Após foram adicionados piruvato, malato, glutamato, succinato e ADP, em iguais concentrações ao protocolo de respirometria, objetivando energizar as mitocôndrias da amostra. Foi monitorada a absorbância por 5min. Para avaliar o influxo de Ca^{2+} para a

mitocôndria foi adicionado 20mM de cálcio, foi monitorado o decréscimo na absorbância por 10 min. Após o platô atingido utilizamos 30mM de Na⁺ para avaliar a capacidade de efluxo de cálcio da mitocôndria, por estímulo do transportador NCLX, monitorou-se por 10 minutos. Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Spectra Max M5, Molecular Devices) no comprimento de 540nm. Os resultados foram normalizados por proteínas e pelo patamar da estabilização inicial da amostra (CARTERI; KOPCZYNSKI; RODOLPHI; STROGULSKI *et al.*, 2019).

Ensaio de potencial de membrana $\Delta\Psi_m$ (Safranina-O) foi realizado nos isolados mitocôndrias dos terços da medula espinhal seguindo o mesmo protocolo sequencial de SDI da respirometria, foi então calculado a variação dos pontos subsequentes para mensurar o fluxo de formação e dissipação do potencial de membrana mitocondrial. As amostras foram incubadas na mesma solução tampão da respirometria com a adição de 10 μ M de Safranina-O, a fluorescência foi medida em um espectrofotômetro (Spectra Max M5, Molecular Devices) com comprimentos de onda entre excitação 495nm e emissão 586nm, onde números positivos de variação indicam uma diminuição no $\Delta\Psi_m$ de membrana mitocondrial, enquanto números negativos indicam um aumento em $\Delta\Psi_m$. O branco foi realizado apenas com adição de solução tampão e safranina-O. As amostras foram normalizadas pela concentração de proteínas (CARTERI; KOPCZYNSKI; MENEGASSI; SALIMEN RODOLPHI *et al.*, 2019).

Ensaio de amplex-red[®] para avaliar a produção de H₂O₂ mitocondrial, foi realizado nos isolados mitocondriais dos terços medulares seguindo o mesmo protocolo SDI (MULLER; HAAS; CAMACHO-PEREIRA; BROCHIER *et al.*, 2013). As amostras foram suplementadas com 10 μ M de amplex red[®] e 2 unidades/ml de peroxidase, foram avaliadas a fluorescência entre excitação 563nm e emissão 587nm (Spectra Max M5, Molecular Devices). As amostras foram normalizadas pela concentração de proteínas.

Western Blot

O Imunoconteúdo foi avaliado, por western blot, nas estruturas cerebrais hipocampo, córtex, hipotálamo, e nos terços proximal e distal da medula. As estruturas foram homogeneizadas em EDTA 2mM, coquetéis de inibidores de protease e fosfatase I e II (Sigma, St. Louis, USA) 0.001 %, Tris HCl 50mM, (pH 7,4), glicerol 10 % e Triton X-100 1 %. As amostras foram normalizadas para que todas tivessem a concentração de 2 μ g/ml de proteína, n = 6. As proteínas de interesse foram separadas pó eletroforese em gel de polyacrilamida de 10 ou 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham, GE

Healthcare, Little Chalfont, RU). Os anticorpos primários utilizados para detecção das proteínas alvo foram Tau e sua subunidade fosforilada Ser³⁹⁶ (ABCAM®, EUA; 1:1000; ref. ab109390);, α -espectrina (Millipore®, ALE; 1:1000; ref. MAB1622), Caspase 3 (Cell Signalling®, EUA; 1:1000; ref. 9664) e suas formas clivadas foram medidas tanto nas porções cerebrais quanto nas medulares, para avaliar a propagação do dano causados pelas CR do cérebro para a medula. Proteínas mitocondriais TOM20 (Cell Signalling®, EUA; 1:1000; ref. 42406) e PGC1 α (ABCAM®, EUA; 1:1000; ref. Ab54481), foram utilizadas para avaliar massa mitocondrial e mitogênese nas porções medulares. Todos os processos seguiram as normas indicadas fabricantes dos anticorpos, todos foram incubados *over-night*, seguidos por incubação de anticorpo secundário *anti-rabbit* ou *anti-mouse* 1:5000, por duas horas (GE, Little Chalfont, UK). As membranas foram incubadas com reagente de detecção ECL (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). A avaliação da quimiluminescência foi feita usando Image Quant LAS 4000 (GE, Little Chalfont, UK). As imagens foram quantificadas usando o software *Imaje J*® (Rockville, EUA). Os resultados foram expressos por percentual do controle. (DE CARVALHO; DA SILVA; SERAFINI; DE SOUZA *et al.*, 2017).

Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos por média \pm desvio padrão, as comparações entre os grupos foi feita por teste de variância de uma ou duas vias (ANOVA) ou teste T de Student, quando necessárias. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 7.0 e *PASW Statistics* 18.0.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando (*) $p < 0,05$.

Resultados

As CR causam dano na medula espinhal

Inicialmente nós realizamos uma caracterização dos danos cerebrais causados pelas CR (figura 1). Demonstramos que existe aumento da fosforilação da proteína TAU (figura 1 B), e da clivagem de α -espectrina (Figura 1 C) e caspase 3 (Figura 1 D), no grupo CR quando comparado ao controle, resultados já esperados pois reproduzem a literatura. Entretanto os mesmos marcadores foram realizados no terço proximal (figura 1 E, F e G) e terço distal (figura 1 H, I e J) da medula e as mesmas alterações foram evidenciadas no terço proximal e houve uma tendência a aumento dos marcadores no terço distal da medula. Vimos a diminuição na atividade das desidrogenases mitocondriais no grupo CR nas três regiões

cerebrais e no terço proximal (figura 1 K e L) da medula quando comparadas ao controle, no terço distal novamente vimos uma tendência à diferença (figura 1 M). Esses resultados indicam que o dano causado pelas CR se propagam para a medula espinhal e além das modificações estruturais e a função mitocondrial está alterada., modificações essas já bem evidentes no terço proximal e mais brandos no terço distal.

Transplante de mitocôndrias melhora parâmetros neurológicos

Após a confirmação do dano à medula espinhal devido as CR, fomos avaliar as implicações motoras derivadas do dano estrutural dos axônios medulares, o tratamento com o transplante de mitocôndrias foi feito 24h antes das avaliações motoras. No teste do campo aberto não foi detectada nenhuma alteração na locomoção ou no perfil exploratório dos animais causadas pelas CR nem pelo transplante de mitocôndrias (figura 2 A). Entretanto ao realizarmos o teste de força nos membros dianteiros dos animais, vimos uma perda de kg força no grupo CR o que foi revertido no grupo CR- MIT, o grupo MIT mostrou uma tendência a um aumento de força quando comparado ao grupo CT (figura 2 B).

No teste do cilindro (figura 2 C), usado para uma motricidade mais fina, vimos a perda de simetria no uso dos membros superiores causado pelas CR, o que foi revertido pelo grupo CR-MIT, porem mesmo estando dentro da faixa de simetria ficou demonstrado uma diferença significativa no numero de toques com as patas (direita ou esquerda). Devido aos indícios evidenciados pelo teste do cilindro utilizamos o teste de equilíbrio para avaliar de maneira mais precisa os danos motores, foi observado que as CR causaram um aumento no tempo total para os animais migrarem da plataforma elevada para suas caixas e um maior número de pisadas erradas, o que foi atenuado pelo tratamento (figura 2 D e E). Isso demonstra um efeito benéfico agudo após o transplante de mitocôndrias.

O transplante de mitocôndrias aumenta proteínas mitocondriais na medula

Inicialmente para avaliar os efeitos mais gerais do transplante de mitocôndrias nos danos causados pelas CR realizamos avaliamos, novamente, a atividade das desidrogenases mitocondrias, o tratamento reverteu os danos causados no terço proximal, entretanto não teve nenhuma alteração no terço distal (figura 3 A e B).

Utilizamos o imunocontéudo da proteína TOM 20 (figura 3 C e D) e o fator de transcrição PGC1 α (figura 3 E e F) para avaliar o número e a indução de biogênese mitocondrial, respectivamente. Inicialmente vimos que o grupo CR apresentou uma

diminuição de TOM 20 na porção distal, indicando uma diminuição da massa mitocondrial na região, entretanto sem alterações na biogênese mitocondrial, o que poderia sugerir morte mitocondrial apenas, essa diminuição revertida no grupo CR-MIT. Também observamos que o transplante de mitocôndrias gerou uma tendência no aumento do imunoconteúdo de ambas proteínas quando comparados ao controle ($p = 0,062$). No terço distal da medula espinhal não houve alterações devido as CR, todavia os grupos transplantados (MIT e CR-MIT) apresentaram um aumento nos marcadores tanto de massa mitocondrial quanto de biogênese, indicando uma possível integração das mitocôndrias transplantadas com as células hospedeiras.

O Transplante de mitocôndrias melhora o controle do cálcio e o perfil bioenergético da medula espinhal

O grupo CR não apresentou modificações no influxo de Ca^{2+} para o interior da mitocôndria, entretanto em ambos os terços da medula as mitocondriais demonstraram um prejuízo na capacidade do transportador NCLX de realizar o efluxo do cálcio da matriz mitocondrial frente ao transporte antiporte de Na^+ , o que foi revertido pelo transplante de mitocôndrias no grupo CR-MIT (figura 4 A e B). Não foi observado alteração no grupo MIT quando comparado ao controle. Associado ao aumento das concentrações intramitocondriais de cálcio no grupo CR, observamos também um prejuízo na formação e dissipação do $\Delta\Psi_m$, provavelmente devido ao aumento de cargas positivas do Ca^{2+} . Estas alterações foram revertidas no grupo CR-MIT, e novamente não houveram modificações no grupo MIT quando comparado ao controle (figura 4 C e D).

Devido aos danos nas membranas mitocondriais, avaliamos a razão do extravasamento de prótons com relação ao sistema de transporte de elétrons. Os resultados demonstraram um aumento no extravasamento de prótons H^+ no grupo CR, perfil este revertido novamente no grupo CR-MIT. Também observamos uma diminuição no grupo MIT em relação ao controle (figura 4 E e F). Para avaliarmos a relação entre o extravasamento de prótons e a formação de espécies reativas de oxigênio, avaliamos a produção de H_2O_2 mitocondrial. Os resultados corroboram o do extravasamento de prótons H^+ , estando aumentado no grupo CR, e reestabelecido ao nível do controle no grupo CR-MIT. O grupo MIT tem menor extravasamento quando comparado ao CT (figura 4 G e H).

Na avaliação da função mitocondrial o grupo CR apresentou uma diminuição na capacidade de transportar elétrons em ambos terços medulares o que foi revertido no grupo

CR-MIT. O grupo MIT apresentou uma maior capacidade do STE com relação ao grupo CT (figura 4 A e B). Quando avaliamos a eficiência bioquímica mitocondrial, ou seja, sua capacidade de fosforilar ADP, observamos que novamente o grupo CR apresentou prejuízo ao longo de toda a medula espinhal, perfil este revertido pelo transplante de mitocôndrias. Ainda, o grupo MIT apresentou uma melhora significativa da sua capacidade fosforilativa quando comparada ao CT (figura 5 C e D).

Para entender os mecanismos envolvidos na melhora causada pelo tratamento nos grupos MIT e CR-MIT, avaliamos as atividades específicas dos complexos respiratórios I e II. Observamos que as concussões causaram uma mudança na utilização dos complexos respiratórios, pois no grupo CR houve uma diminuição da atividade do complexo I (figura 5 E e F) e aumento da atividade do complexo II (figura 5 G e H) com relação ao grupo CT, entretanto após o tratamento, o grupo CR-MIT, conseguiu manter o perfil de atividade de complexo I com relação ao complexo II. Entretanto a melhora na capacidade fosforilativa no grupo MIT, não foi explicada pelas atividades dos complexos respiratórios. Dessa maneira demonstramos que o transplante de mitocôndrias gerou efeitos benéficos a atividade bioenergética oxidativa.

O tratamento diminuiu a neurodegeneração medular causada pelas CR

Realizamos novamente a avaliação dos marcadores associados a neurodegeneração progressiva causada pelas concussões para entender se o perfil bioenergético mitocondrial estaria relacionado a degeneração medular. Demonstramos, uma diminuição da hiperfosforilação da proteína TAU no terço proximal da medula no grupo CR-MIT, entretanto nenhuma melhoria foi observada no terço distal (figura 6 A e B). Com relação a α -espectrina, o tratamento foi capaz de reverter sua clivagem em ambos os terços no grupo MIT-CR (figura 6 C e D). Ainda, a clivagem de Caspase-3, que é um biomarcador clássico da ativação apoptótica foi diminuída pelo transplante mitocondrial (figura 6 E e F).

Discussão

No presente estudo, demonstramos que o transplante mitocondrial conseguiu reestabelecer parâmetros funcionais cruciais afetados pelas CR. Demonstramos uma melhora motora e do perfil neurodegenerativo, possivelmente associado com a melhora bioenergética causada pelo tratamento. Também demonstramos uma aparente capacidade das mitocôndrias

transplantadas de gerarem melhorias por toda a extensão da medula espinhal, pois mesmo sendo injetadas no terço distal da medula foram observadas modificações benéficas no terço proximal.

A perda de mobilidade e força física em pacientes que sofreram trauma raquimedular é bem estabelecida na literatura, muito por conta da degeneração progressiva causada pelo impacto aos axônios presentes na medula (DEWAN; RATTANI; GUPTA; BATICULON *et al.*, 2018; JOHNSON; STEWART; SMITH, 2013; MCFADYEN; CANTIN; SWAINE; DUCHESNEAU *et al.*, 2009; VALLEE; MCFADYEN; SWAINE; DOYON *et al.*, 2006). Porém o trabalho adiciona a novidade de investigar perda de mobilidade mesmo sem impacto direto com a coluna vertebral. Apesar disso outros autores demonstraram, que após TCE severos, podem ocorrer danos em neurônios motores cerebrais que afetem a coordenação e força de pacientes (BRAUN; VAIBHAV; SAAD; FATIMA *et al.*, 2017; PACHALSKA; MANKO; CHANTSOULIS; KNAPIK *et al.*, 2012), mesmo necessitando de estudos complementares para fortalecer a hipótese de não ser apenas por danos ao cérebro, acreditamos que o trabalho traz um caminho para corroborar com a ideia dos danos secundários terem se estendido até a medula espinhal, visto que o tratamento utilizado foi efetuado no terço distal da medula gerou um benefício evidente na motricidade dos animais.

As modificações como diminuição do número de mitocôndrias (TOM20) e diminuição do seu fator de transcrição (PGC1 α), são um achado comum na pesquisa clínica e pré-clínica no campo do TCE (FISCHER; HYLIN; ZHAO; MOORE *et al.*, 2016; MAZZEO; BEAT; SINGH; BULLOCK, 2009). É bem estabelecido que após um única TCE ocorre uma diminuição momentânea no número de mitocôndrias no tecido cerebral, bem como em camundongos acometidos por trauma raquimedular também apresentam diminuição do número e da biogênese de mitocôndrias (CHEN; CUI; ZHAI; ZHANG *et al.*, 2018; MILS; BOSCH; ROY; BEL-VIALAR *et al.*, 2015). Neste trabalho, encontramos as modificações similares aquelas encontradas nos modelos de TRM no nosso modelo de CR (KULBE; HALL, 2017). Um aspecto relevante do modelo é que os efeitos mais proeminentes foram observados no terço proximal da medula espinhal e mais brandos no terço distal, o que sugere que a longo prazo a magnitude das alterações poderiam ser ainda maiores na porção distal. A injeção intratecal de mitocôndrias no terço distal impediu a diminuição da massa mitocondrial assim como aumentou o fator de proliferação de mitocôndrias. Os efeitos benéficos locais no sítio de administração de mitocôndrias podem ter influenciado as diferenças de respostas entre o terço proximal e distal.

A diminuição das desidrogenase mitocondriais é um processo comum a diferentes patologias que estejam relacionadas a algum dano mitocondrial (KHACHO; CLARK; SVOBODA; MACLAURIN *et al.*, 2017; NAKAJIMA; ITAKURA; KUBO; KANESHIGE *et al.*, 2017; SHAKI; SHAYESTE; KARAMI; AKBARI *et al.*, 2017). Esta análise proporciona uma estimativa primária de diminuição atividade metabólica mitocondrial, embora seja muito inespecífica pois não indica exatamente quais são os componentes afetados e suas interações com outros efetores metabólicos. Mesmo assim, No TCE já é bem estabelecido a diminuição da sua atividade global (CARTERI; KOPCZYNSKI; MENEGASSI; SALIMEN RODOLPHI *et al.*, 2019), porem seu declínio na medula espinhal decorrente de CR ainda não havia sido demonstrado.

O balanço iônico intracelular é de extrema importância para o correto funcionamento dos processos celulares(SUN; DESHPANDE; SOMBATI; BARANOVA *et al.*, 2008). Os níveis de Ca^{2+} estão relacionados com os mais distintos tipos de processos celulares(BLENNOW; BRODY; KOCHANNEK; LEVIN *et al.*, 2016; FRATI; CERRETANI; FIASCHI; FRATI *et al.*, 2017; SUN; DESHPANDE; SOMBATI; BARANOVA *et al.*, 2008). Sendo que um dos principais meios tamponantes intracelular de cálcio seja sua captação pela mitocôndria que tem um transportador específico para sua entrada e um mais específico ainda para sua retirada, o NCLX. Como já demonstrado por nosso grupo(CARTERI; KOPCZYNSKI; RODOLPHI; STROGULSKI *et al.*, 2019) o influxo do íon para o interior mitocondrial não é afetado pelo TCE, mas sim sua extrusão . Dados prévios do nosso grupo de pesquisa já haviam sugerido que o prejuízo encontrado no fluxo de cálcio em regiões cerebrais fosse no efluxo (CARTERI; KOPCZYNSKI; RODOLPHI; STROGULSKI *et al.*, 2019). O presente estudo demonstra que na medula, novamente, o prejuízo encontrado é no efluxo de cálcio, fator que é benéficamente modulado com o transplante de mitocôndrias, porem para se saber se é por conta do aumento do numero de mitocôndrias disponíveis ou se é pelo aumento da eficiência do transportador NCLX são necessário estudos complementares visando esse objetivo.

O fluxo do $\Delta\Psi_m$ é um processo extremamente suscetível aos desbalanços iônicos que ocorrem dentro da mitocôndria, tanto que de maneira consonante quando se tem alteração da concentração intra mitocondrial de Ca^{2+} , os processos de formar e dissipar o potencial de membrana mitocondrial ficam prejudicados, o que leva a desestruturação das suas membranas(AHMED; RZIGALINSKI; WILLOUGHBY; SITTERDING *et al.*, 2000; FISCHER; HYLIN; ZHAO; MOORE *et al.*, 2016; SUN; CHEN; GU; WANG *et al.*, 2017).

Modificações deletérias relacionadas ao $\Delta\Psi_m$ e ao TCE já estão bem estabelecidas, porém suas alterações a nível medular e possíveis relações com outros processos deletérios ainda apresentam muitas lacunas (AHMED; RZIGALINSKI; WILLOUGHBY; SITTERDING *et al.*, 2000; LAMADE; KENNY; ANTHONYMUTHU; SOYSAL *et al.*, 2019). O presente estudo se propõe a estabelecer mais fortemente essa conexão, pois demonstramos o prejuízo na funcionalidade da membrana mitocondrial bem como sua associação ao desbalanço iônico e ao subsequente extravasamento de prótons do STE. Também mostramos a associação relacionada ao extravasamento de H^+ nos animais submetidos as CR. Novamente esse processo é um marco estabelecido nas pesquisas relacionadas ao TCE, da mesma forma que o aumento desse extravasamento esta associado com o aumento da produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial.

Um dos desfechos clássicos mais estudados, do dano secundário após o TCE, é a diminuição da bioenergética cerebral, já bem determinada em pacientes e em modelos animais (CHEN; CUI; ZHAI; ZHANG *et al.*, 2018; FISCHER; HYLIN; ZHAO; MOORE *et al.*, 2016; FRATI; CERRETANI; FIASCHI; FRATI *et al.*, 2017; KHACHO; CLARK; SVOBODA; MACLAURIN *et al.*, 2017; MILS; BOSCH; ROY; BEL-VIALAR *et al.*, 2015). Trabalhos testado drogas que visem melhorar a atividade mitocondrial em modelos pré-clínicos para o tratamento de diferentes condições patológicas, incluindo vítimas de TCE. No presente estudo, as concussões desencadearam danos na capacidade de transportar elétrons e na eficiência fosforilativa bem como aumento na produção de peróxido de hidrogênio no grupo CR Outro ponto importante demonstrado no presente estudo é a mudança no perfil respiratório de utilização dos complexos I e II no TCE, onde no grupo CR existe uma preferência pela respiração via complexo II sendo esse perfil novamente normalizado pelo tratamento. O complexo II é considerado um dos principais sítios de produção de peróxido de hidrogênio o que poderia justificar o aumento observado no grupo CR. Mais experimentos são necessários para se poder consolidar que a mudança desse perfil esteja diretamente relacionada aos mecanismos deletério bioenergéticos associados ao TCE.

A desestruturação dos microtúbulos devido a hiperfosforilação da proteína TAU, bem como a clivagem de α -espectrina desestabilizando os filamentos de actina axonais são biomarcadores clássicos de lesão axonal difusa, pois são os principais mantenedores da estrutura física do axônio (ALONSO; COHEN; CORBO; MOROZOVA *et al.*, 2018; CHEN; SHI; ZHENG; LUO *et al.*, 2016; KOBESSY; LIU; YANG; ZHANG *et al.*, 2015; RUBENSTEIN; CHANG; YUE; CHIU *et al.*, 2017; WANG; YANG; ZHU; SHI *et al.*, 2018).

Associado a desestruturação axonal está o aumento de vias apoptóticas relacionadas também com a mitocôndria por meio da via BAX – BCL2 que culmina em liberação do conteúdo mitocondrial de citocromo-c que ativa vias apoptóticas caspase dependente, que geram no final clivagem de caspase 3 que sinaliza para a morte celular (DU, 2016; QIU; SHI; ZHUANG; ZHANG *et al.*, 2017). Os resultados obtidos reproduziram a literatura para as modificações nas três regiões cerebrais classicamente atingidas pelo TCE (córtex, hipocampo e hipotálamo). O transplante de mitocôndrias reverteu o perfil neurodegenerativo, porém os mecanismos ainda necessitam de maiores esclarecimentos.

O presente estudo apresentou evidências que traumas isolados no crânio, irradiam alterações deletérias para toda a extensão da medula espinhal. Além disso, os resultados sugerem que a bioenergética mitocondrial exerce um papel relevante tanto para propagar o dano medular quanto para atenuá-lo, o que parece ser mecanisticamente associado a integridade mitocondrial ou sua proliferação. Embora preliminar, os resultados mostram que o transplante de mitocôndrias tem potencial terapêutico para combater os prejuízos motores, bioquímicos e principalmente bioenergéticos causados pelas concussões repetidas. Porém reconhecer em quais células as mitocôndrias transplantadas estão se integrando é de extrema importância para melhor compreender as possibilidades desse tipo de abordagem.

Referências

1. Faul, M. and Coronado, V. (2015). Epidemiology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol* 127, 3-13.
2. Langlois, J.A., Rutland-Brown, W. and Wald, M.M. (2006). The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 21, 375-378.
3. Jassam, Y.N., Izzy, S., Whalen, M., McGavern, D.B. and El Khoury, J. (2017). Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron* 95, 1246-1265.
4. Hiebert, J.B., Shen, Q., Thimmesch, A.R. and Pierce, J.D. (2015). Traumatic brain injury and mitochondrial dysfunction. *Am J Med Sci* 350, 132-138.
5. Sun, D., Chen, X., Gu, G., Wang, J. and Zhang, J. (2017). Potential Roles of Mitochondria-Associated ER Membranes (MAMs) in Traumatic Brain Injury. *Cell Mol Neurobiol* 37, 1349-1357.

6. Kulbe, J.R., Hill, R.L., Singh, I.N., Wang, J.A. and Hall, E.D. (2017). Synaptic Mitochondria Sustain More Damage than Non-Synaptic Mitochondria after Traumatic Brain Injury and Are Protected by Cyclosporine A. *J Neurotrauma* 34, 1291-1301.
7. Kamins, J. and Giza, C.C. (2016). Concussion-Mild Traumatic Brain Injury: Recoverable Injury with Potential for Serious Sequelae. *Neurosurg Clin N Am* 27, 441-452.
8. Choe, M.C. (2016). The Pathophysiology of Concussion. *Curr Pain Headache Rep* 20, 42.
9. Kulbe, J.R. and Hall, E.D. (2017). Chronic traumatic encephalopathy-integration of canonical traumatic brain injury secondary injury mechanisms with tau pathology. *Prog Neurobiol* 158, 15-44.
10. Manley, G., Gardner, A.J., Schneider, K.J., Guskiewicz, K.M., Bailes, J., Cantu, R.C., Castellani, R.J., Turner, M., Jordan, B.D., Randolph, C., Dvorak, J., Hayden, K.A., Tator, C.H., McCrory, P. and Iverson, G.L. (2017). A systematic review of potential long-term effects of sport-related concussion. *Br J Sports Med* 51, 969-977.
11. Carteri, R.B., Kopczynski, A., Menegassi, L.N., Salimen Rodolphi, M., Strogulski, N.R. and Portela, L.V. (2019). Anabolic-androgen steroids effects on bioenergetics responsiveness of synaptic and extrasynaptic mitochondria. *Toxicol Lett* 307, 72-80.
12. Wang, K.K., Yang, Z., Zhu, T., Shi, Y., Rubenstein, R., Tyndall, J.A. and Manley, G.T. (2018). An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. *Expert Rev Mol Diagn* 18, 165-180.
13. du, Z.Q. (2016). BAX, a novel cell pro-apoptotic protein, involved in hemocytes early antiviral immune response in fresh water crayfish, *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol* 55, 384-392.
14. Qiu, X., Shi, L., Zhuang, H., Zhang, H., Wang, J., Wang, L., Sun, P., Yu, L. and Liu, L. (2017). Cerebrovascular Protective Effect of Boldine Against Neural Apoptosis via Inhibition of Mitochondrial Bax Translocation and Cytochrome C Release. *Med Sci Monit* 23, 4109-4116.
15. Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R.L., Cepero, E. and Boise, L.H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* 14, 32.
16. Glushakova, O.Y., Glushakov, A.O., Borlongan, C.V., Valadka, A.B., Hayes, R.L. and Glushakov, A.V. (2018). Role of Caspase-3-Mediated Apoptosis in Chronic Caspase-3-Cleaved Tau Accumulation and Blood-Brain Barrier Damage in the Corpus Callosum after Traumatic Brain Injury in Rats. *J Neurotrauma* 35, 157-173.

17. Frati, A., Cerretani, D., Fiaschi, A.I., Frati, P., Gatto, V., La Russa, R., Pesce, A., Pinchi, E., Santurro, A., Frascchetti, F. and Fineschi, V. (2017). Diffuse Axonal Injury and Oxidative Stress: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* 18.
18. Sun, D.A., Deshpande, L.S., Sombati, S., Baranova, A., Wilson, M.S., Hamm, R.J. and DeLorenzo, R.J. (2008). Traumatic brain injury causes a long-lasting calcium (Ca²⁺)-plateau of elevated intracellular Ca levels and altered Ca²⁺ homeostatic mechanisms in hippocampal neurons surviving brain injury. *Eur J Neurosci* 27, 1659-1672.
19. Naviaux, R.K. (2014). Metabolic features of the cell danger response. *Mitochondrion* 16, 7-17.
20. Refakis, C.A., Turner, C.D. and Cahill, P.J. (2017). Sports-related Concussion in Children and Adolescents. *Clin Spine Surg* 30, 191-196.
21. Steenerson, K. and Starling, A.J. (2017). Pathophysiology of Sports-Related Concussion. *Neurol Clin* 35, 403-408.
22. Bombardier, C.H., Lee, D.C., Tan, D.L., Barber, J.K. and Hoffman, J.M. (2016). Comorbid Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury: Screening Validity and Effect on Outcomes. *Arch Phys Med Rehabil* 97, 1628-1634.
23. Johnson, V.E., Stewart, W. and Smith, D.H. (2013). Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 246, 35-43.
24. Lamade, A.M., Kenny, E.M., Anthony-muthu, T.S., Soysal, E., Clark, R.S.B., Kagan, V.E. and Bayir, H. (2019). Aiming for the target: Mitochondrial drug delivery in traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 145, 209-219.
25. Sharma, A., Liaw, K., Sharma, R., Zhang, Z., Kannan, S. and Kannan, R.M. (2018). Targeting Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Activated Microglia using Dendrimer-Based Therapeutics. *Theranostics* 8, 5529-5547.
26. McCully, J.D., Cowan, D.B., Emani, S.M. and Del Nido, P.J. (2017). Mitochondrial transplantation: From animal models to clinical use in humans. *Mitochondrion* 34, 127-134.
27. Ma, E.L., Smith, A.D., Desai, N., Cheung, L., Hanscom, M., Stoica, B.A., Loane, D.J., Shea-Donohue, T. and Faden, A.I. (2017). Bidirectional brain-gut interactions and chronic pathological changes after traumatic brain injury in mice. *Brain, behavior, and immunity* 66, 56-69.
28. Zimmer, E.R., Torrez, V.R., Kalinine, E., Augustin, M.C., Zenki, K.C., Almeida, R.F., Hansel, G., Muller, A.P., Souza, D.O., Machado-Vieira, R. and Portela, L.V. (2015). Long-term NMDAR antagonism correlates reduced astrocytic glutamate uptake with anxiety-like phenotype. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9.

29. Montilla-Garcia, A., Tejada, M.A., Perazzoli, G., Entrena, J.M., Portillo-Salido, E., Fernandez-Segura, E., Canizares, F.J. and Cobos, E.J. (2017). Grip strength in mice with joint inflammation: A rheumatology function test sensitive to pain and analgesia. *Neuropharmacology* 125, 231-242.
30. Roome, R.B. and Vanderluit, J.L. (2015). Paw-dragging: a novel, sensitive analysis of the mouse cylinder test. *J Vis Exp*, e52701.
31. Carter, R.J., Morton, J. and Dunnett, S.B. (2001). Motor coordination and balance in rodents. *Current protocols in neuroscience* Chapter 8, Unit 8.12.
32. Sims, N.R. and Anderson, M.F. (2008). Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nature protocols* 3, 1228-1239.
33. Muller, A.P., Haas, C.B., Camacho-Pereira, J., Brochier, A.W., Gnoatto, J., Zimmer, E.R., de Souza, D.O., Galina, A. and Portela, L.V. (2013). Insulin prevents mitochondrial generation of H₂O₂ in rat brain. *Experimental neurology* 247, 66-72.
34. Portela, L.V., Gnoatto, J., Brochier, A.W., Haas, C.B., de Assis, A.M., de Carvalho, A.K., Hansel, G., Zimmer, E.R., Oses, J.P. and Muller, A.P. (2015). Intracerebroventricular metformin decreases body weight but has pro-oxidant effects and decreases survival. *Neurochemical research* 40, 514-523.
35. Carteri, R.B., Kopczynski, A., Rodolphi, M.S., Strogulski, N.R., Sartor, M., Feldmann, M., De Bastiani, M.A., Duval Wannmacher, C.M., de Franceschi, I.D., Hansel, G., Smith, D.H. and Portela, L.V. (2019). Testosterone Administration after Traumatic Brain Injury Reduces Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Journal of neurotrauma*.
36. de Carvalho, A.K., da Silva, S., Serafini, E., de Souza, D.R., Farias, H.R., de Bem Silveira, G., Silveira, P.C., de Souza, C.T., Portela, L.V. and Muller, A.P. (2017). Prior Exercise Training Prevent Hyperglycemia in STZ Mice by Increasing Hepatic Glycogen and Mitochondrial Function on Skeletal Muscle. *Journal of cellular biochemistry* 118, 678-685.
37. Dewan, M.C., Rattani, A., Gupta, S., Baticulon, R.E., Hung, Y.C., Punchak, M., Agrawal, A., Adeleye, A.O., Shrimel, M.G., Rubiano, A.M., Rosenfeld, J.V. and Park, K.B. (2018). Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 1-18.
38. McFadyen, B.J., Cantin, J.F., Swaine, B., Duchesneau, G., Doyon, J., Dumas, D. and Fait, P. (2009). Modality-specific, multitask locomotor deficits persist despite good recovery after a traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 90, 1596-1606.
39. Vallee, M., McFadyen, B.J., Swaine, B., Doyon, J., Cantin, J.F. and Dumas, D. (2006). Effects of environmental demands on locomotion after traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil* 87, 806-813.

40. Braun, M., Vaibhav, K., Saad, N.M., Fatima, S., Vender, J.R., Baban, B., Hoda, M.N. and Dhandapani, K.M. (2017). White matter damage after traumatic brain injury: A role for damage associated molecular patterns. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863, 2614-2626.
41. Pachalska, M., Manko, G., Chantsoulis, M., Knapik, H., Mirski, A. and Mirska, N. (2012). The quality of life of persons with TBI in the process of a comprehensive rehabilitation program. *Med Sci Monit* 18, Cr432-442.
42. Mazzeo, A.T., Beat, A., Singh, A. and Bullock, M.R. (2009). The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI. *Exp Neurol* 218, 363-370.
43. Fischer, T.D., Hylin, M.J., Zhao, J., Moore, A.N., Waxham, M.N. and Dash, P.K. (2016). Altered Mitochondrial Dynamics and TBI Pathophysiology. *Front Syst Neurosci* 10, 29.
44. Chen, X., Cui, J., Zhai, X., Zhang, J., Gu, Z., Zhi, X., Weng, W., Pan, P., Cao, L., Ji, F., Wang, Z. and Su, J. (2018). Inhalation of Hydrogen of Different Concentrations Ameliorates Spinal Cord Injury in Mice by Protecting Spinal Cord Neurons from Apoptosis, Oxidative Injury and Mitochondrial Structure Damages. *Cell Physiol Biochem* 47, 176-190.
45. Mils, V., Bosch, S., Roy, J., Bel-Vialar, S., Belenguer, P., Pituello, F. and Miquel, M.C. (2015). Mitochondrial reshaping accompanies neural differentiation in the developing spinal cord. *PLoS One* 10, e0128130.
46. Nakajima, H., Itakura, M., Kubo, T., Kaneshige, A., Harada, N., Izawa, T., Azuma, Y.T., Kuwamura, M., Yamaji, R. and Takeuchi, T. (2017). Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Aggregation Causes Mitochondrial Dysfunction during Oxidative Stress-induced Cell Death. *J Biol Chem* 292, 4727-4742.
47. Khacho, M., Clark, A., Svoboda, D.S., MacLaurin, J.G., Lagace, D.C., Park, D.S. and Slack, R.S. (2017). Mitochondrial dysfunction underlies cognitive defects as a result of neural stem cell depletion and impaired neurogenesis. *Hum Mol Genet* 26, 3327-3341.
48. Shaki, F., Shayeste, Y., Karami, M., Akbari, E., Rezaei, M. and Ataei, R. (2017). The effect of epicatechin on oxidative stress and mitochondrial damage induced by homocysteine using isolated rat hippocampus mitochondria. *Res Pharm Sci* 12, 119-127.
49. Blennow, K., Brody, D.L., Kochanek, P.M., Levin, H., McKee, A., Ribbers, G.M., Yaffe, K. and Zetterberg, H. (2016). Traumatic brain injuries. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16084.
50. Ahmed, S.M., Rzigalinski, B.A., Willoughby, K.A., Sitterding, H.A. and Ellis, E.F. (2000). Stretch-induced injury alters mitochondrial membrane potential and cellular ATP in cultured astrocytes and neurons. *J Neurochem* 74, 1951-1960.

51. Zhang, X., Li, Z., Zhang, Q., Chen, L., Huang, X., Zhang, Y., Liu, X., Liu, W. and Li, W. (2018). Mechanisms Underlying H₂O₂-Evoked Carbonyl Modification of Cytoskeletal Protein and Axon Injury in PC-12 Cells. *Cell Physiol Biochem* 48, 1088-1098.
52. Szarka, N., Pabbidi, M.R., Amrein, K., Czeiter, E., Berta, G., Pohoczky, K., Helyes, Z., Ungvari, Z., Koller, A., Buki, A. and Toth, P. (2018). Traumatic Brain Injury Impairs Myogenic Constriction of Cerebral Arteries: Role of Mitochondria-Derived H₂O₂ and TRPV4-Dependent Activation of BK_{Ca} Channels. *J Neurotrauma*.
53. Zhang, Q., Zhang, M., Huang, X., Liu, X. and Li, W. (2016). Inhibition of cytoskeletal protein carbonylation may protect against oxidative damage in traumatic brain injury. *Exp Ther Med* 12, 4107-4112.
54. Chen, S., Shi, Q., Zheng, S., Luo, L., Yuan, S., Wang, X., Cheng, Z. and Zhang, W. (2016). Role of alpha-II-spectrin breakdown products in the prediction of the severity and clinical outcome of acute traumatic brain injury. *Exp Ther Med* 11, 2049-2053.
55. Kobeissy, F.H., Liu, M.C., Yang, Z., Zhang, Z., Zheng, W., Glushakova, O., Mondello, S., Anagli, J., Hayes, R.L. and Wang, K.K. (2015). Degradation of betaII-Spectrin Protein by Calpain-2 and Caspase-3 Under Neurotoxic and Traumatic Brain Injury Conditions. *Mol Neurobiol* 52, 696-709.
56. Alonso, A.D., Cohen, L.S., Corbo, C., Morozova, V., ElIdrissi, A., Phillips, G. and Kleiman, F.E. (2018). Hyperphosphorylation of Tau Associates With Changes in Its Function Beyond Microtubule Stability. *Front Cell Neurosci* 12, 338.
57. Rubenstein, R., Chang, B., Yue, J.K., Chiu, A., Winkler, E.A., Puccio, A.M., Diaz-Arrastia, R., Yuh, E.L., Mukherjee, P., Valadka, A.B., Gordon, W.A., Okonkwo, D.O., Davies, P., Agarwal, S., Lin, F., Sarkis, G., Yadikar, H., Yang, Z., Manley, G.T., Wang, K.K.W., Cooper, S.R., Dams-O'Connor, K., Borrasso, A.J., Inoue, T., Maas, A.I.R., Menon, D.K., Schnyer, D.M. and Vassar, M.J. (2017). Comparing Plasma Phospho Tau, Total Tau, and Phospho Tau-Total Tau Ratio as Acute and Chronic Traumatic Brain Injury Biomarkers. *JAMA Neurol* 74, 1063-1072.

Figuras e Legendas

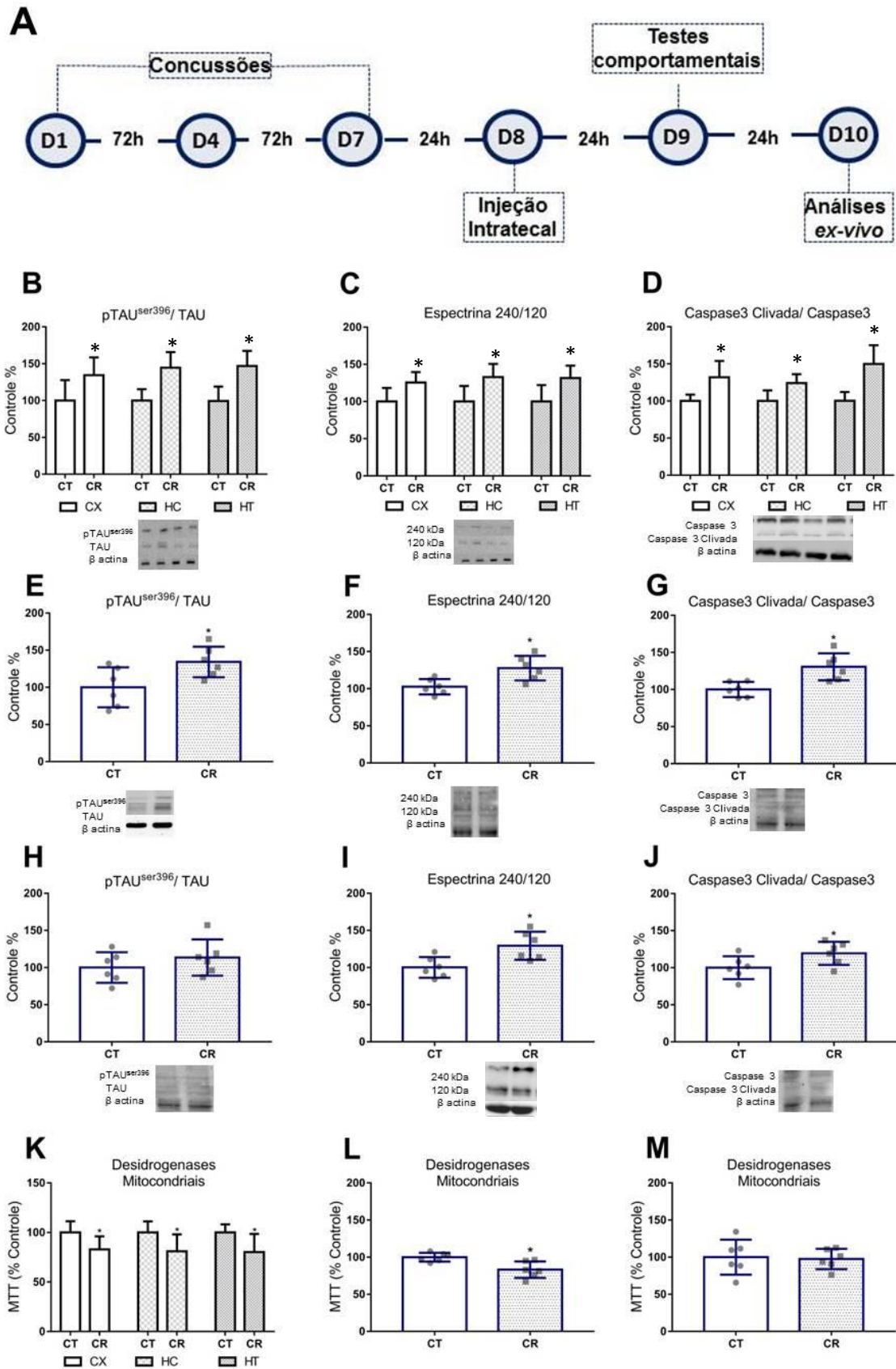


Figura 1. Desenho experimental (A). As CR foram induzidas com intervalo de 72h entre os eventos, após 24h de repouso os animais foram tratados, via intratecal, com veículo ou mitocôndrias isoladas. Os testes motores foram realizados 24h após o tratamento. Os animais foram eutanasiados 48h pós transplante de mitocôndrias (A). Para caracterização do modelo causado por CR foram avaliados em córtex, hipocampo e hipotálamo, os estabilizadores de citoesqueleto pTAU^{ser396}/TAU (B) e α -espectrina clivada/ α -espectrina (C), e apoptóticos a Caspase-3 clivada (D). Estas análises também foram realizadas em homogeneizados de medula no TP (E, F e G) e TD (H, I, J), como indicadores medulares da progressão do dano. A atividade de desidrogenases mitocondriais foram avaliadas como um indicador de atividade metabólica global e inespecífica nas três regiões cerebrais (K) e nas porções medulares TP (L) e TD (M). * Representa diferença estatística comparado ao controle ($p < 0,05$). Abreviações: CR, *concussões repetidas*; TP, *terço proximal da medula*; TD, *Terço distal da medula*.

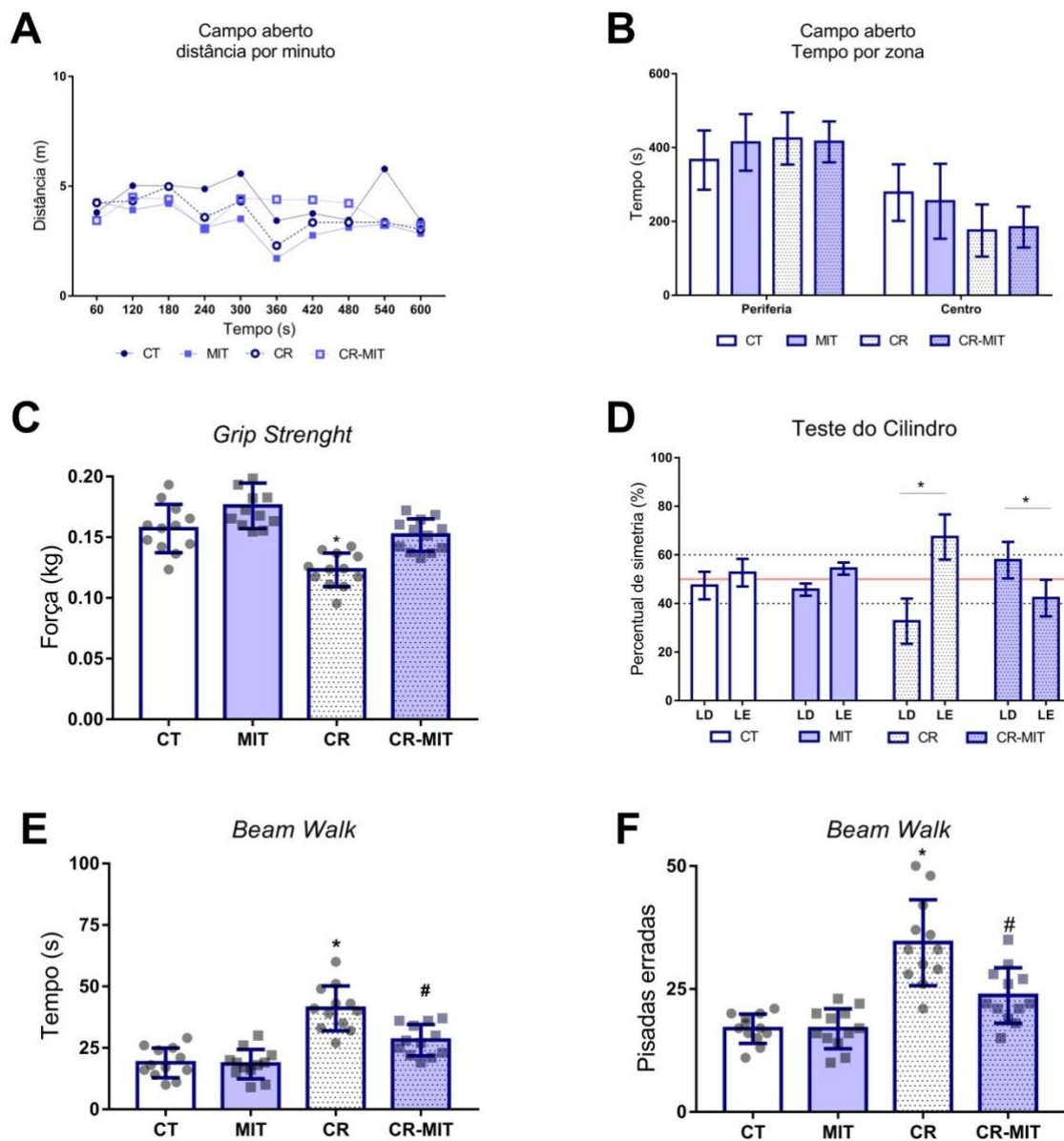


Figura 2. Atividade motora dos animais. Para avaliar possíveis danos na locomoção e no perfil exploratório dos animais, mensuramos a distância total (m) percorrida por minuto (A) e o tempo gasto despendido (s) em cada zona do campo aberto (B). O grip strength avaliou a força dos membros superiores dos animais em relação a capacidade de segurar um dinamômetro (C). Teste do cilindro foi utilizado para avaliar a simetria do movimento das patas dianteiras após as CR (D). O teste de *beam walk* foi utilizado como indicador de motricidade fina, observando o tempo para o animal retornar para sua caixa (E) e o número de vezes que o animal errou a pisada durante uma travessia (F). * representa diferença estatística a todos os grupos, # representa diferença estatística quando comparado ao grupo CR.

($p < 0,05$). Abreviações: *CT*, controle; *MIT*, transplante mitocôndria; *CR*, concussões repetidas; *CR-MIT*, concussões repetidas e transplante.

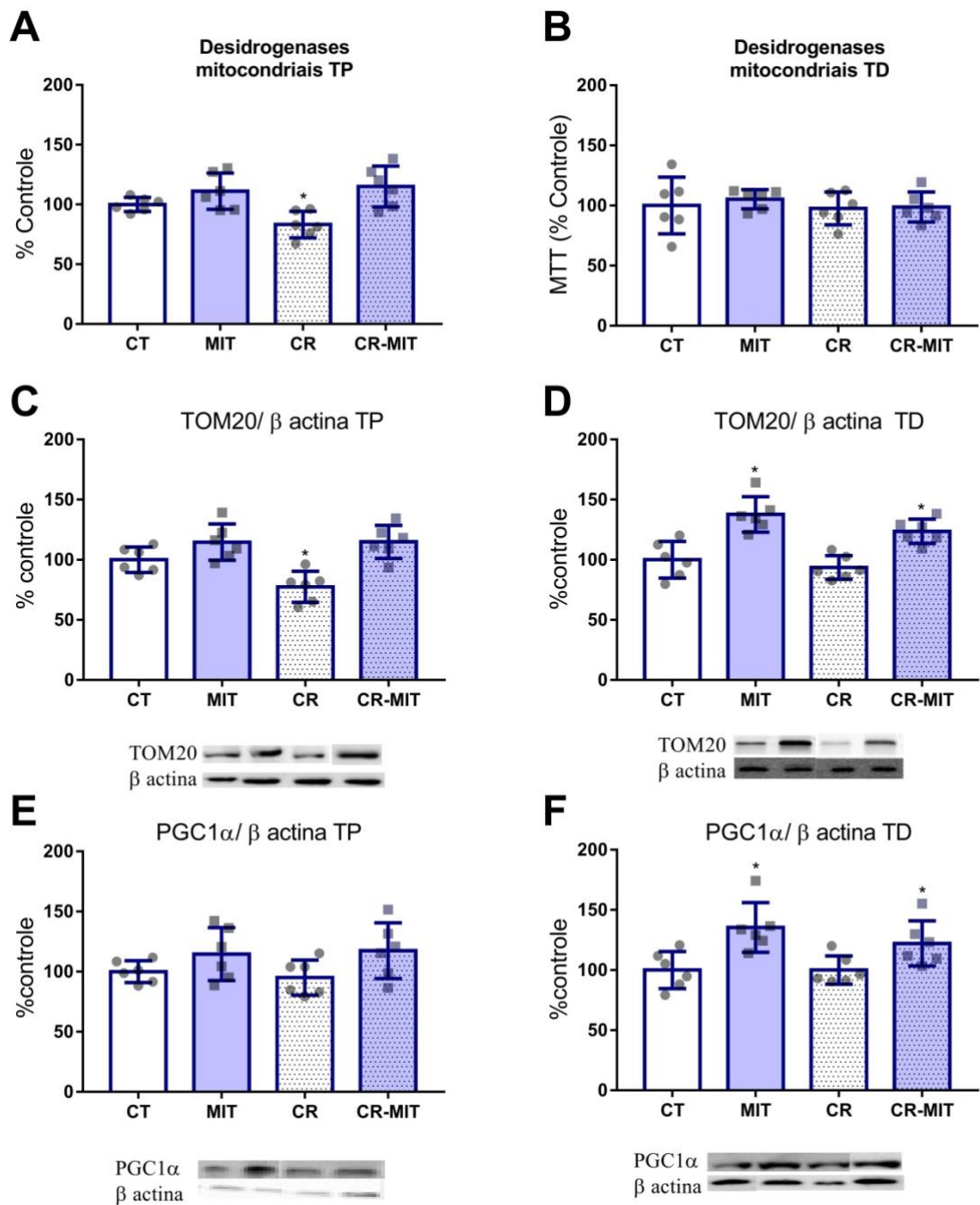


Figura 3. Marcadores das mitocôndrias transplantadas. Avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais foram novamente utilizadas para avaliar uma integração geral do tratamento com as células hospedeiras em TP (A) e TD (B). A quantidade total de mitocôndrias presentes na medula foi avaliada pelo imunoconteúdo de TOM20 em TP (C) e TD (D). A biogênese mitocondrial foi avaliada pelo imunoconteúdo de PGC1α em TP (E) e TD (F). * representa diferença estatística comparado a todos os grupos experimentais. ($p < 0,05$). Abreviações: CT, controle; MIT, transplante mitocôndria; CR, concussões repetidas; CR-MIT, concussões repetidas e transplante.

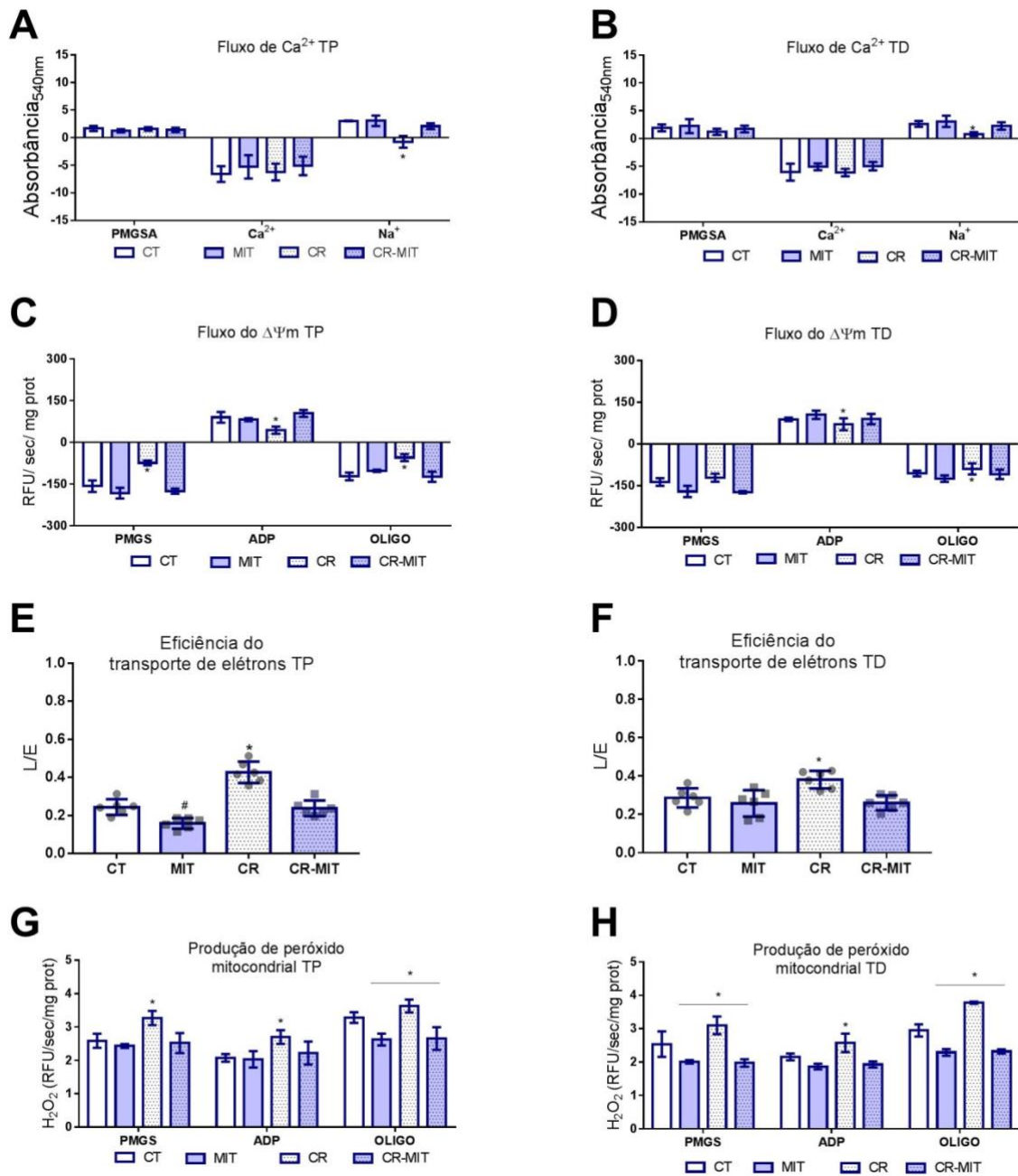


Figura 4. Fluxo de cálcio, potencial de membrana e produção de H_2O_2 mitocondrial. O fluxo de Ca^{2+} mitocondrial, sua dinâmica de influxo e efluxo mediada pelo transportador NCLX foram medidos em isolados de mitocôndria em TP (A) e TD (B). A dinâmica do $\Delta\Psi\text{m}$ (polarização e despolarização) foram avaliadas nos em TP e TD (C e D). Os efeitos do desbalanço iônico do cálcio e distúrbios do $\Delta\Psi\text{m}$ no escape de prótons foi avaliado pela razão de L/E (E e F). A formação de peróxido de hidrogênio mitocondrial foi medida em TP (G) e TD (H). * representa diferença estatística comparado a todos os grupos, # representa diferença

estatística quando comparado ao grupo CR ($p < 0,05$). *Abreviações: CT, controle; MIT, transplante mitocôndria; CR, concussões repetidas; CR-MIT, concussões repetidas e transplante.*

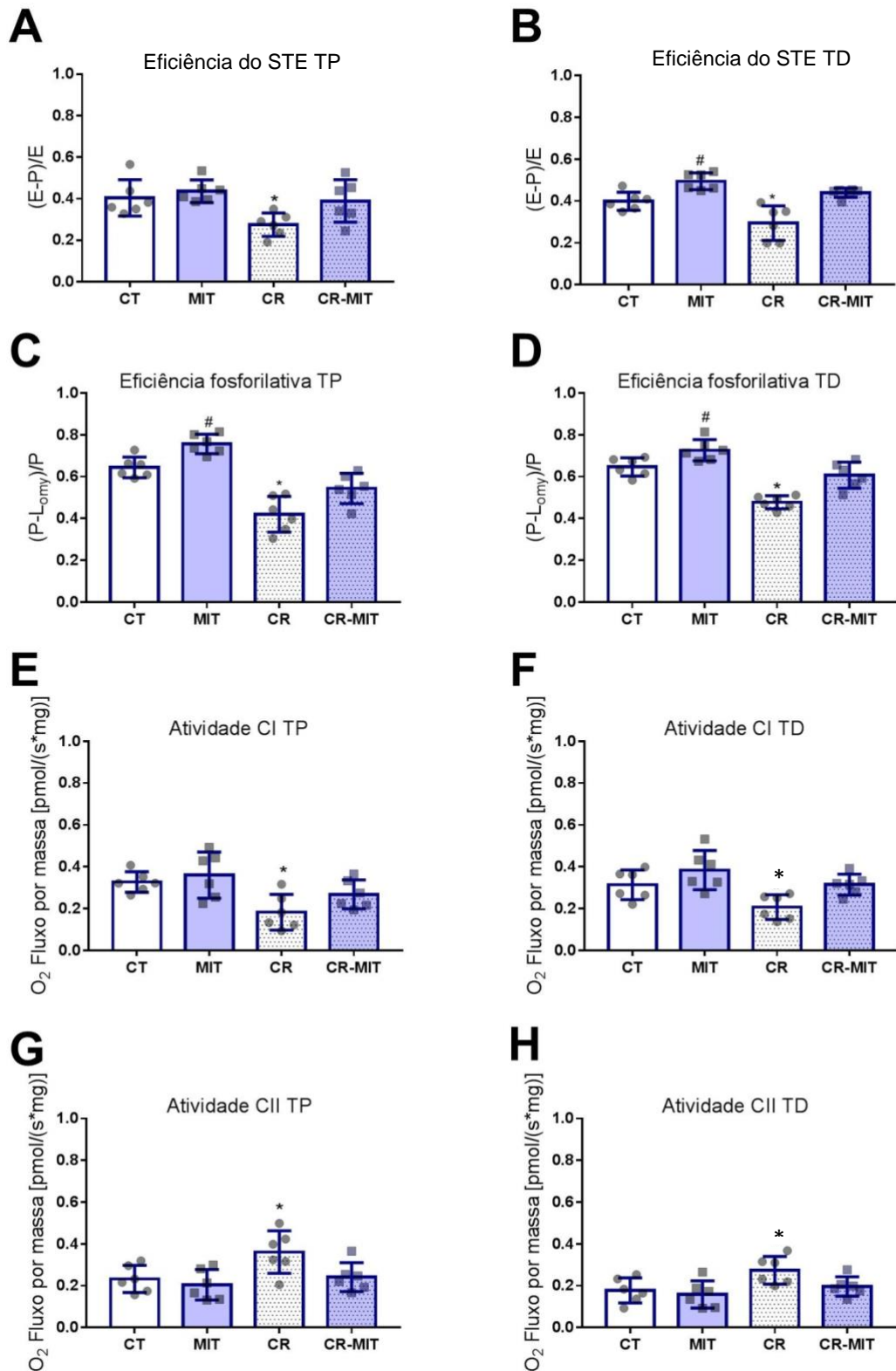


Figura 5. Painel bioenergético mitocondrial. A eficiência do STE foi expressa pela cálculo de $(E-P)/E$, que demonstra a capacidade de fluxo de elétrons que excede a capacidade fosforilativa mitocondrial (A e B). A eficiência bioquímica foi definida por $(P-L)/P$, que

expressa a capacidade respiratória mitocondrial relacionada diretamente com a fosforilação de ADP pela mitocôndria (C e D). A atividade dos complexos I e II (CI e CII) foram calculadas levando em consideração a respiração fosforilativa máxima com relação ao fluxo específico por complexos usando Rotenona para avaliar CI (E e F) e Malonato para CII (G e H). * representa diferença estatística comparado a todos os grupos, # representa diferença estatística quando comparado ao grupo CR ($p < 0,05$). *Abreviações: CT, controle; MIT, transplante mitocôndria; CR, concussões repetidas; CR-MIT, concussões repetidas e transplante.*

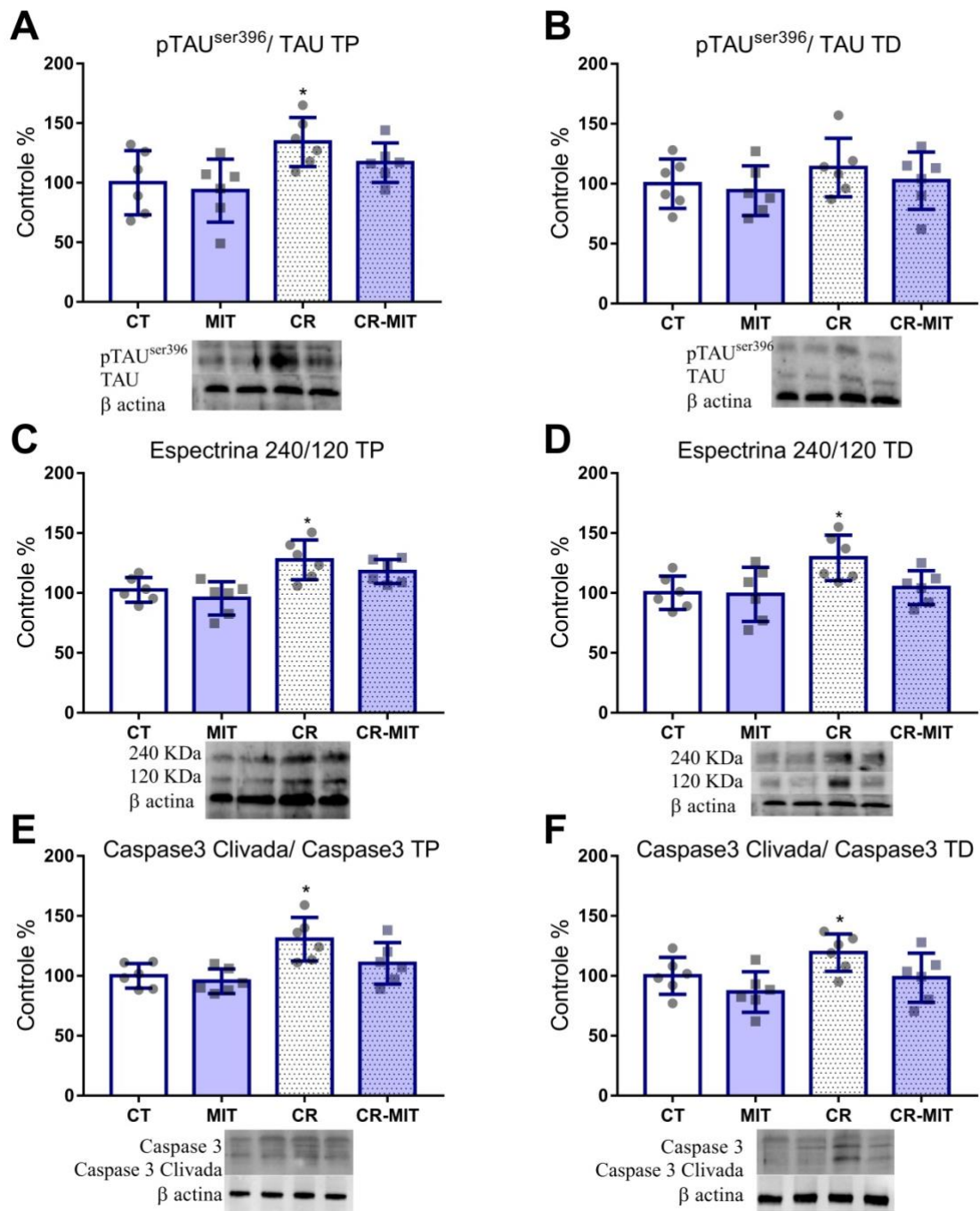


Figura 6. Marcadores de dano axonal e neurodegeneração apoptótica. Os efeitos do tratamento na fosforilação do principal estabilizador de microtúbulos pTAU^{ser396}/TAU foi realizada em TP (A) e TD (B). Os níveis do imunoc conteúdo de α -espectrina, estabilizador de filamentos de actina, foram avaliados em TP (C) e TD (D). A clivagem de Caspase 3 foi medida para avaliar a sinalização apoptótica caspase dependente (E e F). * representa

diferença estatística comparado a todos os grupos CR ($p < 0,05$). *Abreviações: CT, controle; MIT, transplante mitocôndria; CR, concussões repetidas; CR-MIT, concussões repetidas e transplante.*

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados preliminares do estudo apresentado, demonstramos que de fato existe uma propagação do dano causado pelas CR para toda a extensão da medula espinhal, evidenciado pela alteração de marcadores clássicos de degeneração ligados ao TCE. O trabalho demonstrou mais uma vez, corroborando com a literatura, a importância da função mitocondrial e como ela é afetada após as CR. Apresentamos evidências preliminares de que um transplante de mitocôndrias pode reverter os danos bioenergéticos medulares causados pelas CR, por toda a extensão da medula indicando também que as mitocôndrias transplantadas estão se integrando com o metabolismo hospedeiro e migrando pela medula.

Para futura publicação do trabalho marcadores no líquido serão dosados para proporcionar mais evidências de neurodegeneração da medula espinhal causada pelo TCE. Outros testes comportamentais serão realizados para caracterizar melhor os danos motores causados pelas CR. Serão realizados experimentos de imunohistoquímica, para avaliar estruturalmente a integridade dos feixes axonais bem como será avaliado a composição lipídica da medula como indicador adicional da degeneração progressiva. Iremos realizar testes para melhor entender em quais tipos celulares as mitocôndrias estão se acoplando.

Iremos avaliar o perfil inflamatório do animal transplantado, pois as mitocôndrias são provenientes de outro animal podendo gerar alguma resposta inflamatória para combater o tratamento. Pretendemos avaliar os efeitos do transplante e sua aceitação pelo organismo por mais tempo do que 48 horas.

Ainda temos o objetivo de avaliar se as mitocôndrias transplantadas no terço distal da medula são capazes de migrarem para o cérebro, e gerar benefícios. Por fim, o artigo será reescrito em inglês para futura submissão ao periódico *Journal of Neurotrauma*.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; WU, P. H.; HUGHES, E. G.; FUKAYA, M. *et al.* Transient Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Microdomain Calcium Transients in Astrocyte Processes. **Neuron**, 93, n. 3, p. 587-605.e587, Feb 8 2017.
- AHMED, S. M.; RZIGALINSKI, B. A.; WILLOUGHBY, K. A.; SITTERDING, H. A. *et al.* Stretch-induced injury alters mitochondrial membrane potential and cellular ATP in cultured astrocytes and neurons. **J Neurochem**, 74, n. 5, p. 1951-1960, May 2000.
- ALONSO, A. D.; COHEN, L. S.; CORBO, C.; MOROZOVA, V. *et al.* Hyperphosphorylation of Tau Associates With Changes in Its Function Beyond Microtubule Stability. **Front Cell Neurosci**, 12, p. 338, 2018.
- BEN-SHACHAR, D.; ENE, H. M. Mitochondrial Targeted Therapies: Where Do We Stand in Mental Disorders? **Biol Psychiatry**, 83, n. 9, p. 770-779, May 1 2018.
- BLENNOW, K.; BRODY, D. L.; KOCHANEK, P. M.; LEVIN, H. *et al.* Traumatic brain injuries. **Nat Rev Dis Primers**, 2, p. 16084, Nov 17 2016.
- BLENNOW, K.; HARDY, J.; ZETTERBERG, H. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. **Neuron**, 76, n. 5, p. 886-899, Dec 6 2012.
- BOMBARDIER, C. H.; LEE, D. C.; TAN, D. L.; BARBER, J. K. *et al.* Comorbid Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury: Screening Validity and Effect on Outcomes. **Arch Phys Med Rehabil**, 97, n. 10, p. 1628-1634, Oct 2016.
- BRAUN, M.; VAIBHAV, K.; SAAD, N. M.; FATIMA, S. *et al.* White matter damage after traumatic brain injury: A role for damage associated molecular patterns. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1863, n. 10 Pt B, p. 2614-2626, Oct 2017.
- BRENTNALL, M.; RODRIGUEZ-MENOCAL, L.; DE GUEVARA, R. L.; CEPERO, E. *et al.* Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biol**, 14, p. 32, Jul 9 2013.
- CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor coordination and balance in rodents. **Curr Protoc Neurosci**, Chapter 8, p. Unit 8.12, Aug 2001.
- CARTERI, R. B.; KOPCZYNSKI, A.; MENEGASSI, L. N.; SALIMEN RODOLPHI, M. *et al.* Anabolic-androgen steroids effects on bioenergetics responsiveness of synaptic and extrasynaptic mitochondria. **Toxicol Lett**, 307, p. 72-80, Jun 1 2019.

- CARTERI, R. B.; KOPCZYNSKI, A.; RODOLPHI, M. S.; STROGULSKI, N. R. *et al.* Testosterone Administration after Traumatic Brain Injury Reduces Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. **J Neurotrauma**, Apr 9 2019.
- CHEN, S.; SHI, Q.; ZHENG, S.; LUO, L. *et al.* Role of alpha-II-spectrin breakdown products in the prediction of the severity and clinical outcome of acute traumatic brain injury. **Exp Ther Med**, 11, n. 5, p. 2049-2053, May 2016.
- CHEN, X.; CUI, J.; ZHAI, X.; ZHANG, J. *et al.* Inhalation of Hydrogen of Different Concentrations Ameliorates Spinal Cord Injury in Mice by Protecting Spinal Cord Neurons from Apoptosis, Oxidative Injury and Mitochondrial Structure Damages. **Cell Physiol Biochem**, 47, n. 1, p. 176-190, 2018.
- CHOE, M. C. The Pathophysiology of Concussion. **Curr Pain Headache Rep**, 20, n. 6, p. 42, Jun 2016.
- CONTRERAS, L.; DRAGO, I.; ZAMPESE, E.; POZZAN, T. Mitochondria: the calcium connection. **Biochim Biophys Acta**, 1797, n. 6-7, p. 607-618, Jun-Jul 2010.
- DANESHVAR, D. H.; GOLDSTEIN, L. E.; KIERNAN, P. T.; STEIN, T. D. *et al.* Post-traumatic neurodegeneration and chronic traumatic encephalopathy. **Mol Cell Neurosci**, 66, n. Pt B, p. 81-90, May 2015.
- DASH, P. K.; ZHAO, J.; HERGENROEDER, G.; MOORE, A. N. Biomarkers for the diagnosis, prognosis, and evaluation of treatment efficacy for traumatic brain injury. **Neurotherapeutics**, 7, n. 1, p. 100-114, Jan 2010.
- DE CARVALHO, A. K.; DA SILVA, S.; SERAFINI, E.; DE SOUZA, D. R. *et al.* Prior Exercise Training Prevent Hyperglycemia in STZ Mice by Increasing Hepatic Glycogen and Mitochondrial Function on Skeletal Muscle. **J Cell Biochem**, 118, n. 4, p. 678-685, Apr 2017.
- DEWAN, M. C.; RATTANI, A.; GUPTA, S.; BATICULON, R. E. *et al.* Estimating the global incidence of traumatic brain injury. **J Neurosurg**, p. 1-18, Apr 1 2018.
- DU, Z. Q. BAX, a novel cell pro-apoptotic protein, involved in hemocytes early antiviral immune response in fresh water crayfish, *Procambarus clarkii*. **Fish Shellfish Immunol**, 55, p. 384-392, Aug 2016.
- EL-HATTAB, A. W.; ZARANTE, A. M.; ALMANNAI, M.; SCAGLIA, F. Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. **Mol Genet Metab**, 122, n. 3, p. 1-9, Nov 2017.
- EMANI, S. M.; PIEKARSKI, B. L.; HARRILD, D.; DEL NIDO, P. J. *et al.* Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 154, n. 1, p. 286-289, Jul 2017.

FAUL, M.; CORONADO, V. Epidemiology of traumatic brain injury. **Handb Clin Neurol**, 127, p. 3-13, 2015.

FISCHER, T. D.; HYLIN, M. J.; ZHAO, J.; MOORE, A. N. *et al.* Altered Mitochondrial Dynamics and TBI Pathophysiology. **Front Syst Neurosci**, 10, p. 29, 2016.

FRATI, A.; CERRETANI, D.; FIASCHI, A. I.; FRATI, P. *et al.* Diffuse Axonal Injury and Oxidative Stress: A Comprehensive Review. **Int J Mol Sci**, 18, n. 12, Dec 2 2017.

GLUSHAKOVA, O. Y.; GLUSHAKOV, A. O.; BORLONGAN, C. V.; VALADKA, A. B. *et al.* Role of Caspase-3-Mediated Apoptosis in Chronic Caspase-3-Cleaved Tau Accumulation and Blood-Brain Barrier Damage in the Corpus Callosum after Traumatic Brain Injury in Rats. **J Neurotrauma**, 35, n. 1, p. 157-173, Jan 1 2018.

HIEBERT, J. B.; SHEN, Q.; THIMMESCH, A. R.; PIERCE, J. D. Traumatic brain injury and mitochondrial dysfunction. **Am J Med Sci**, 350, n. 2, p. 132-138, Aug 2015.

HIRANO, M.; EMMANUELE, V.; QUINZII, C. M. Emerging therapies for mitochondrial diseases. **Essays Biochem**, 62, n. 3, p. 467-481, Jul 20 2018.

IVERSON, G. L.; GARDNER, A. J.; TERRY, D. P.; PONSFORD, J. L. *et al.* Predictors of clinical recovery from concussion: a systematic review. **Br J Sports Med**, 51, n. 12, p. 941-948, Jun 2017.

JASSAM, Y. N.; IZZY, S.; WHALEN, M.; MCGAVERN, D. B. *et al.* Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. **Neuron**, 95, n. 6, p. 1246-1265, Sep 13 2017.

JOHNSON, V. E.; STEWART, W.; ARENA, J. D.; SMITH, D. H. Traumatic Brain Injury as a Trigger of Neurodegeneration. **Adv Neurobiol**, 15, p. 383-400, 2017.

JOHNSON, V. E.; STEWART, W.; SMITH, D. H. Axonal pathology in traumatic brain injury. **Exp Neurol**, 246, p. 35-43, Aug 2013.

KAMINS, J.; GIZA, C. C. Concussion-Mild Traumatic Brain Injury: Recoverable Injury with Potential for Serious Sequelae. **Neurosurg Clin N Am**, 27, n. 4, p. 441-452, Oct 2016.

KAUR, P.; SHARMA, S. Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. **Curr Neuropharmacol**, 16, n. 8, p. 1224-1238, 2018.

KEHREIN, K.; BONNEFOY, N.; OTT, M. Mitochondrial protein synthesis: efficiency and accuracy. **Antioxid Redox Signal**, 19, n. 16, p. 1928-1939, Dec 1 2013.

KHACHO, M.; CLARK, A.; SVOBODA, D. S.; MACLAURIN, J. G. *et al.* Mitochondrial dysfunction underlies cognitive defects as a result of neural stem cell depletion and impaired neurogenesis. **Hum Mol Genet**, 26, n. 17, p. 3327-3341, Sep 1 2017.

KOBEISSY, F. H.; LIU, M. C.; YANG, Z.; ZHANG, Z. *et al.* Degradation of betaII-Spectrin Protein by Calpain-2 and Caspase-3 Under Neurotoxic and Traumatic Brain Injury Conditions. **Mol Neurobiol**, 52, n. 1, p. 696-709, Aug 2015.

KULBE, J. R.; HALL, E. D. Chronic traumatic encephalopathy-integration of canonical traumatic brain injury secondary injury mechanisms with tau pathology. **Prog Neurobiol**, 158, p. 15-44, Nov 2017.

KULBE, J. R.; HILL, R. L.; SINGH, I. N.; WANG, J. A. *et al.* Synaptic Mitochondria Sustain More Damage than Non-Synaptic Mitochondria after Traumatic Brain Injury and Are Protected by Cyclosporine A. **J Neurotrauma**, 34, n. 7, p. 1291-1301, Apr 1 2017.

LAMADE, A. M.; KENNY, E. M.; ANTHONYMUTHU, T. S.; SOYSAL, E. *et al.* Aiming for the target: Mitochondrial drug delivery in traumatic brain injury. **Neuropharmacology**, 145, n. Pt B, p. 209-219, Feb 2019.

LANGLOIS, J. A.; RUTLAND-BROWN, W.; WALD, M. M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. **J Head Trauma Rehabil**, 21, n. 5, p. 375-378, Sep-Oct 2006.

LAWRENCE, D. W.; HUTCHISON, M. Concerns with novel concussion protocol. **Br J Sports Med**, 51, n. 7, p. 620-621, Apr 2017.

LEVIN, H. S.; DIAZ-ARRASTIA, R. R. Diagnosis, prognosis, and clinical management of mild traumatic brain injury. **Lancet Neurol**, 14, n. 5, p. 506-517, May 2015.

LORENTE, L.; MARTIN, M. M.; ARGUESO, M.; RAMOS, L. *et al.* Serum caspase-3 levels and mortality are associated in patients with severe traumatic brain injury. **BMC Neurol**, 15, p. 228, Nov 6 2015.

LUONGO, T. S.; LAMBERT, J. P.; GROSS, P.; NWOKEDI, M. *et al.* The mitochondrial Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger is essential for Ca⁽²⁺⁾ homeostasis and viability. **Nature**, 545, n. 7652, p. 93-97, May 4 2017.

MA, E. L.; SMITH, A. D.; DESAI, N.; CHEUNG, L. *et al.* Bidirectional brain-gut interactions and chronic pathological changes after traumatic brain injury in mice. **Brain Behav Immun**, 66, p. 56-69, Nov 2017.

MANLEY, G.; GARDNER, A. J.; SCHNEIDER, K. J.; GUSKIEWICZ, K. M. *et al.* A systematic review of potential long-term effects of sport-related concussion. **Br J Sports Med**, 51, n. 12, p. 969-977, Jun 2017.

MAZZEO, A. T.; BEAT, A.; SINGH, A.; BULLOCK, M. R. The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI. **Exp Neurol**, 218, n. 2, p. 363-370, Aug 2009.

MCCULLY, J. D.; COWAN, D. B.; EMANI, S. M.; DEL NIDO, P. J. Mitochondrial transplantation: From animal models to clinical use in humans. **Mitochondrion**, 34, p. 127-134, May 2017.

MCFADYEN, B. J.; CANTIN, J. F.; SWAINE, B.; DUCHESNEAU, G. *et al.* Modality-specific, multitask locomotor deficits persist despite good recovery after a traumatic brain injury. **Arch Phys Med Rehabil**, 90, n. 9, p. 1596-1606, Sep 2009.

MEANEY, D. F.; MORRISON, B.; DALE BASS, C. The mechanics of traumatic brain injury: a review of what we know and what we need to know for reducing its societal burden. **J Biomech Eng**, 136, n. 2, p. 021008, Feb 2014.

MILS, V.; BOSCH, S.; ROY, J.; BEL-VIALAR, S. *et al.* Mitochondrial reshaping accompanies neural differentiation in the developing spinal cord. **PLoS One**, 10, n. 5, p. e0128130, 2015.

MONTILLA-GARCIA, A.; TEJADA, M. A.; PERAZZOLI, G.; ENTRENA, J. M. *et al.* Grip strength in mice with joint inflammation: A rheumatology function test sensitive to pain and analgesia. **Neuropharmacology**, 125, p. 231-242, Oct 2017.

MULLER, A. P.; HAAS, C. B.; CAMACHO-PEREIRA, J.; BROCHIER, A. W. *et al.* Insulin prevents mitochondrial generation of H₂O₂ in rat brain. **Exp Neurol**, 247, p. 66-72, Sep 2013.

NAKAJIMA, H.; ITAKURA, M.; KUBO, T.; KANESHIGE, A. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Aggregation Causes Mitochondrial Dysfunction during Oxidative Stress-induced Cell Death. **J Biol Chem**, 292, n. 11, p. 4727-4742, Mar 17 2017.

NAVIAUX, R. K. Metabolic features of the cell danger response. **Mitochondrion**, 16, p. 7-17, May 2014.

PACHALSKA, M.; MANKO, G.; CHANTSOULIS, M.; KNAPIK, H. *et al.* The quality of life of persons with TBI in the process of a comprehensive rehabilitation program. **Med Sci Monit**, 18, n. 7, p. Cr432-442, Jul 2012.

PFANNER, N.; WARSCHEID, B.; WIEDEMANN, N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. **Nat Rev Mol Cell Biol**, Jan 9 2019.

PORTELA, L. V.; GNOATTO, J.; BROCHIER, A. W.; HAAS, C. B. *et al.* Intracerebroventricular metformin decreases body weight but has pro-oxidant effects and decreases survival. **Neurochem Res**, 40, n. 3, p. 514-523, Mar 2015.

- QIU, X.; SHI, L.; ZHUANG, H.; ZHANG, H. *et al.* Cerebrovascular Protective Effect of Boldine Against Neural Apoptosis via Inhibition of Mitochondrial Bax Translocation and Cytochrome C Release. **Med Sci Monit**, 23, p. 4109-4116, Aug 25 2017.
- REFAKIS, C. A.; TURNER, C. D.; CAHILL, P. J. Sports-related Concussion in Children and Adolescents. **Clin Spine Surg**, 30, n. 5, p. 191-196, Jun 2017.
- ROOME, R. B.; VANDERLUIT, J. L. Paw-dragging: a novel, sensitive analysis of the mouse cylinder test. **J Vis Exp**, n. 98, p. e52701, Apr 29 2015.
- ROOZENBEEK, B.; MAAS, A. I.; MENON, D. K. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. **Nat Rev Neurol**, 9, n. 4, p. 231-236, Apr 2013.
- ROSENFELD, J. V.; MAAS, A. I.; BRAGGE, P.; MORGANTI-KOSSMANN, M. C. *et al.* Early management of severe traumatic brain injury. **Lancet**, 380, n. 9847, p. 1088-1098, Sep 22 2012.
- RUBENSTEIN, R.; CHANG, B.; YUE, J. K.; CHIU, A. *et al.* Comparing Plasma Phospho Tau, Total Tau, and Phospho Tau-Total Tau Ratio as Acute and Chronic Traumatic Brain Injury Biomarkers. **JAMA Neurol**, 74, n. 9, p. 1063-1072, Sep 1 2017.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol**, 24, n. 10, p. R453-462, May 19 2014.
- SHAKI, F.; SHAYESTE, Y.; KARAMI, M.; AKBARI, E. *et al.* The effect of epicatechin on oxidative stress and mitochondrial damage induced by homocysteine using isolated rat hippocampus mitochondria. **Res Pharm Sci**, 12, n. 2, p. 119-127, Apr 2017.
- SHARMA, A.; LIAW, K.; SHARMA, R.; ZHANG, Z. *et al.* Targeting Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Activated Microglia using Dendrimer-Based Therapeutics. **Theranostics**, 8, n. 20, p. 5529-5547, 2018.
- SHIN, B.; COWAN, D. B.; EMANI, S. M.; DEL NIDO, P. J. *et al.* Mitochondrial Transplantation in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. **Adv Exp Med Biol**, 982, p. 595-619, 2017.
- SIMS, N. R.; ANDERSON, M. F. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. **Nat Protoc**, 3, n. 7, p. 1228-1239, 2008.
- SINGH, L.; PUSHKER, N.; SAINI, N.; SEN, S. *et al.* Expression of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 proteins in human retinoblastoma. **Clin Exp Ophthalmol**, 43, n. 3, p. 259-267, Apr 2015.
- STEENERSON, K.; STARLING, A. J. Pathophysiology of Sports-Related Concussion. **Neurol Clin**, 35, n. 3, p. 403-408, Aug 2017.

SUN, D.; CHEN, X.; GU, G.; WANG, J. *et al.* Potential Roles of Mitochondria-Associated ER Membranes (MAMs) in Traumatic Brain Injury. **Cell Mol Neurobiol**, 37, n. 8, p. 1349-1357, Nov 2017.

SUN, D. A.; DESHPANDE, L. S.; SOMBATI, S.; BARANOVA, A. *et al.* Traumatic brain injury causes a long-lasting calcium (Ca²⁺)-plateau of elevated intracellular Ca levels and altered Ca²⁺ homeostatic mechanisms in hippocampal neurons surviving brain injury. **Eur J Neurosci**, 27, n. 7, p. 1659-1672, Apr 2008.

SZARKA, N.; PABBIDI, M. R.; AMREIN, K.; CZEITER, E. *et al.* Traumatic Brain Injury Impairs Myogenic Constriction of Cerebral Arteries: Role of Mitochondria-Derived H₂O₂ and TRPV4-Dependent Activation of BK_{Ca} Channels. **J Neurotrauma**, Jan 12 2018.

VALLEE, M.; MCFADYEN, B. J.; SWAINE, B.; DOYON, J. *et al.* Effects of environmental demands on locomotion after traumatic brain injury. **Arch Phys Med Rehabil**, 87, n. 6, p. 806-813, Jun 2006.

WALENSKY, L. D. Targeting BAX to drug death directly. **Nat Chem Biol**, 15, n. 7, p. 657-665, Jul 2019.

WANG, K. K.; YANG, Z.; ZHU, T.; SHI, Y. *et al.* An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury. **Expert Rev Mol Diagn**, 18, n. 2, p. 165-180, Feb 2018.

WINKLER, E. A.; MINTER, D.; YUE, J. K.; MANLEY, G. T. Cerebral Edema in Traumatic Brain Injury: Pathophysiology and Prospective Therapeutic Targets. **Neurosurg Clin N Am**, 27, n. 4, p. 473-488, Oct 2016.

ZHANG, Q.; ZHANG, M.; HUANG, X.; LIU, X. *et al.* Inhibition of cytoskeletal protein carbonylation may protect against oxidative damage in traumatic brain injury. **Exp Ther Med**, 12, n. 6, p. 4107-4112, Dec 2016.

ZHANG, X.; LI, Z.; ZHANG, Q.; CHEN, L. *et al.* Mechanisms Underlying H₂O₂-Evoked Carbonyl Modification of Cytoskeletal Protein and Axon Injury in PC-12 Cells. **Cell Physiol Biochem**, 48, n. 3, p. 1088-1098, 2018.

ZIMMER, E. R.; TORREZ, V. R.; KALININE, E.; AUGUSTIN, M. C. *et al.* Long-term NMDAR antagonism correlates reduced astrocytic glutamate uptake with anxiety-like phenotype. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 9, n. 219, 2015-June-03 2015. Original Research.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLITT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiol Rev**, 94, n. 3, p. 909-950, Jul 2014.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA Journal of neurotrauma

Instructions for Authors

The *Journal of Neurotrauma* publishes papers dealing with all aspects of neurotrauma. This includes the anatomy, biochemistry, biophysics, immunology, pathology, pharmacology, and physiology of brain, spinal, and nerve injury. Papers published in this journal emphasize morphological, physiological, and biochemical studies of injured neurons and glial cells, mechanisms and treatments of acute and chronic injury of the nervous system, neural and glial regeneration, transplantation, in vivo and in vitro injury models, cellular growth factors, blood flow, and metabolism of injured nervous tissues, and recovery of function. Both laboratory and clinical studies are encouraged.

The journal will consider original research papers, short communications, reviews, and letters to the editor. Case reports are not accepted by the Journal. All submissions, except letters, must be accompanied by an abstract of about 250 words and keywords (<5). Original research papers should have an Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion sections. Short communications should have no sections and 6 manuscript pages or less, two tables or two figures or one of each. Reviews are invited and will be considered.

MANUSCRIPTS

GENERAL INSTRUCTIONS

Full mailing information should be included if not on title page, then the following page. Corresponding author should be identified on title page. Prepare text double-spaced throughout. Leave ample margins on sides, top and bottom of the page. Please submit text in Microsoft Word. On the first page, give the full title of the paper, **full name(s) and institutional affiliation(s)** of author(s) with the highest academic degrees and institutional titles. Provide a running title (<45 characters) and a Table of Contents title (<75 characters), if the full title is longer than these limits. **We require the full mailing address and contact information** (telephone, fax, and e-mail address) for EACH author listed on your article. Please include the address (es). **Please also indicate the corresponding author.** Supply an

abstract (<250 words) which presents the reasons for the study, the main findings (with specific data), the principal conclusions, and a list of key words (maximum of 5). Original research papers should contain the following sections: introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, tables, and figure legends. One subsection level is allowed. Short communications should be prepared similarly to original papers. Begin each section on a separate page.

New Reference Style

Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references. Number all references in the order they are cited in the text; do not alphabetize. In-text citations should be in numerical order, superscripted, not contained within parentheses or brackets, and placed **after** punctuation. All references in text should be included in the reference list, and all references in the reference list should have a corresponding citation in the main text of the manuscript.

Preparation of Reference Section:

- Begin the Reference section on a separate page after the Author Disclosure Statement section
- Double-space entire section
- Personal communications, unpublished data, or manuscripts “in preparation” or “submitted for publication” should **not** be included in the Reference section. If necessary, these should be included at the appropriate place in the body of the text. Personal communications should include the contact’s first initial and last name, and the month and year of the communication.
- List all authors and/or editors for each listed article.
- Abbreviate journal titles in accordance with PubMed/Medline (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)
- For journal article titles, capitalize only the first letter of the title.
- References to abstracts should be indicated as such, with the abstract number included, if applicable
- For book citations, volume and edition numbers should be included when appropriate.

Sample Styles:

Lieutaud, T., Ndiaye, A., Laumon, B., and Chiron, M. (2012). Spinal cord injuries sustained in road crashes are not on the decrease in France: a study based on epidemiological trends. *J. Neurotrauma* 29, 479-487.

Bele, S., and Brawanski, A. (2009). Biomarkers and surrogate markers, in: *Neurotrauma and Critical Care of the Brain*. J. Jallo, and C.M. Loftus (eds). Theime Publishing: New York, pps. 42-52.

TABLE AND ILLUSTRATIONS

Type tables double-spaced in a separate file, number tables with Arabic numerals, and provide a legend for each table. Tabular data should not be duplicated in figures.

The top of the illustration should be indicated. A legend should be supplied for each illustration, and all legends numbered consecutively and provided (double-spaced) in a separate file. Figures should be numbered in the order cited in the text. A complete set should be submitted the manuscript. Images should not show the name of the manufacturer. Please keep in mind that the figures will be reduced, so please do not submit large figures/graphs that contain small type, as the text within the figure will not be readable after reduction. Photomicrographs should be cropped to 8cm width. Electron photomicrographs should have internal scale markers. If a figure consists of two or more parts, individual parts should have similar dimensions.

Please follow these instructions carefully when preparing figure files for uploading:

- Do not include any illustrations as part of your text file.
- Do not prepare any figures in Word as they are not workable and will be rejected for production.
- Line illustrations must be submitted at 900 DPI.
- Halftones and color photos should be submitted at a minimum of 300 DPI. (NB: 600 DPI images are more desirable for production).
- PowerPoint files cannot be uploaded to Manuscript Central.

- Save art as either TIFF or EPS files. Do not submit JPEG files. (JPEG files are for screen representation-quality only and will print very poorly during the printing process.) To ensure proper print quality, please submit only TIFF or EPS files.
- **Color art must be saved as CYMK not RGB.** (NB: If RGB files are submitted, the files will be converted to CYMK and some color variation will occur).
- Label figures and tables inside the files in addition to naming the file with the figure or table number. (I.e., When figures or table files are opened, the figure or table number should appear inside the file.)
- When naming your figure files, please label them with your last name, followed by a period (.), and then list the figure number. Ex: Smith.Fig 1. Label figures and tables inside the files in addition to naming the file with the figure or table number. (I.e., when figure or table files are opened, the figure or table number should appear inside the file.)

Color illustrations can be printed in the journal with a subsidy from the author(s). Please contact the Publisher for further details.

IMPORTANT:

Please upload individual files of all manuscript material—do NOT upload a single PDF file containing all text, figure, and table files of your paper. Once all individual files are uploaded on to Manuscript Central, the system will automatically create a single PDF proof for you and the peer-review process.

Disclosure Statement

Immediately following the Acknowledgments section, include a section entitled “Author Disclosure Statement.” In this portion of the paper, authors must disclose any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with submitted manuscripts. This statement should include appropriate information for EACH author, thereby representing that competing financial interests of all authors have been appropriately disclosed according to the policy of the Journal. It is important that all conflicts of interest, whether they are actual or potential, be disclosed. This information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. Please see the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals

at <http://www.icmje.org/index.html#conflicts> for further guidance. If no conflicts exist, the authors must state "No competing financial interests exist."

If no conflicts exist, the authors must state "No competing financial interests exist."

ABBREVIATIONS, NOMENCLATURE, AND SYMBOLS

Consult the "Style Manual for Biologic Journals," 4th Edition, 1978 (American Institute of Biological Sciences, 1401 Wilson Blvd, Arlington, VA 22209.) Identify medications, materials, and devices by full nonproprietary name, brand name, and the manufacturer's name, city, state, and country. Place this information in parentheses in the text.

PERMISSIONS

Materials taken from other sources must be accompanied by a written statement from both author and publisher giving permission to the journal for reproduction. If clearances are required by the author's institution, statements concerning such clearance should be provided in the manuscript.

ANIMAL OR HUMAN EXPERIMENTATION

Reports of research involving human and/or animal experimental subjects should be accompanied by a statement to the Editor, indicating approval by an Institutional Animal Care and Use Committee, Institutional Review Board or equivalent.