



## EFEITOS DA INDUÇÃO DE SEPSE SOBRE O MECANISMO DE UPRMT NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE CAMUNDONGOS

**Palavras-Chave:** UPR mitocondrial, sepse, inflamação

**Autores/as:**

**Livia Caroline Lopes Silva [FCA - UNICAMP]**

**Prof. Dr. Carlos Kiyoshi Katashima (coorientador) [FCA - UNICAMP]**

**Prof. Dr. Eduardo Rochete Ropelle (orientador) [FCA - UNICAMP]**

### 1. INTRODUÇÃO:

Sabe-se que a sepse é hoje, uma das infecções mais séria que existe, podendo acarretar diversos problemas crônicos de saúde, muitas vezes levando o paciente a óbito. No ano de 2017, foi constatado que houve cerca de 47,8 milhões de infecções por sepse e 11 milhões de mortes (Rudd K. E. et al. 2020, 200 - 211). A Revista Brasileira de Terapia Intensiva, aponta a sepse como uma inflamação de alto grau, que é capaz de comprometer o funcionamento dos órgãos vitais, levando suas vítimas a óbito (quadro popularmente conhecido como 'falência de múltiplos órgãos').

No quadro de sepse, é comum notarmos os pacientes em um quadro de caquexia (ou sarcopenia), que é uma resposta fisiológica ao jejum ou desnutrição. A perda de massa e força muscular pode resultar em uma quebra excessiva de proteínas, acompanhada de uma síntese proteica mais baixa e, é essa perda de função muscular que pode ocasionar a mortalidade. Durante o processo de degradação de proteínas, as mitocôndrias também são degradadas e, essa perda é responsável pela diminuição da capacidade de resistência dos músculos atrofiados (Cohen, S., Nathan, J. & Goldberg, A., p.58-74, 2015). Portanto, é imprescindível a homeostase mitocondrial para que haja bom funcionamento das proteínas musculares e, para isso é importante que haja o bom funcionamento da via PINK1-Mfn2-Parkin, via que faz a remoção das mitocôndrias danificadas para manter um pool mitocondrial mais saudável, mas acaba diminuindo a quantidade dessas mitocôndrias (Ji LL, Yeo D., 2019).

Entende-se por UPR mitocondrial, a resposta ativada durante um estresse mitocondrial (função mitocondrial diminuída), com o intuito de promover a sobrevivência da célula e a recuperação da função das mitocôndrias. A disfunção mitocondrial e OXPHOS é a principal causa das doenças mitocondriais e, geralmente são causadas por mutações nos genes que codificam proteínas OXPHOS ou genes para montagem da cadeia respiratória e complexo de ATP sintase (Shpilka, T., Haynes, C., p. 109-120, 2018). Durante o processo de ativação da UPR mitocondrial, também ocorre a ativação da transcrição de chaperonas (HSP60), próteses (CLpP) e, a LONP1 e YME1L1 são enviadas para manter a proteostase mitocondrial (Muri EMF, 2014).

### 2. METODOLOGIA:

#### 2.1 Desenho geral do estudo

Neste estudo, foi realizado o procedimento de indução de sepse em camundongos C57, para posterior análise da musculatura esquelética. Os animais foram separados em três grupos diferentes: tratado (grupo sepse, com seis animais), Sham (grupo controle que foram apenas operados e não tiveram perfuração do ceco, com cinco animais) e o controle (sem nenhum tipo de intervenção, com

cinco animais. Para realização da análise, foi utilizado o método de Western Blot, as proteínas quantificadas foram LONP1, HSP60, YME1L1, CLpP, OXPHOS, peIF2 $\alpha$ , CHOP, PPERK, IRE1. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas, nº 2736-1.

## 2.2 Procedimentos

Para realizar o experimento de indução de sepse, os seis animais foram anestesiados (um por vez). Após isso, foi realizado um pequeno corte com bisturi na linha média longitudinal, para separar a musculatura abdominal do peritônio (sem seccionar). Em seguida, foi localizado o ceco do animal e exposto, para que fosse possível realizar sua perfuração. Por fim, recolocasse o ceco dentro da barriga do animal e, o peritônio e a musculatura abdominal foram fechados através de suturas. Os camundongos do grupo Sham, também foram anestesiados e o corte com bisturi da linha média longitudinal, mas não tiveram o ceco perfurado.

Antes da extração dos animais, todos foram pesados, para analisar se houve uma perda de peso significativa com a sepse e, também confirmar se realmente a sepse pode deixar o animal em estado de caquexia.

## 2.3 Análise dos Resultados

Para a análise, foi realizado a técnica de Western Blotting, o conteúdo proteico avaliado foi o da LONP1, YME1L1, CLpP, HSP60, OXPHOS, peIF2 $\alpha$ , CHOP, pPerk e IRE1. Todas as análises obtiveram diferença estatística significativa, corroborando com a hipótese de que a sepse, por ser uma inflamação de alto grau, acaba prejudicando a função das proteínas e por consequência a expressão da UPR mitocondrial e das proteínas de estresse de retículo endoplasmático.

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados por intermédio do test t de Student entre os grupos (controle, Shan, tratado) e, a significância adotada foi  $p < 0,05$ . Todos os dados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism versão 9.0.

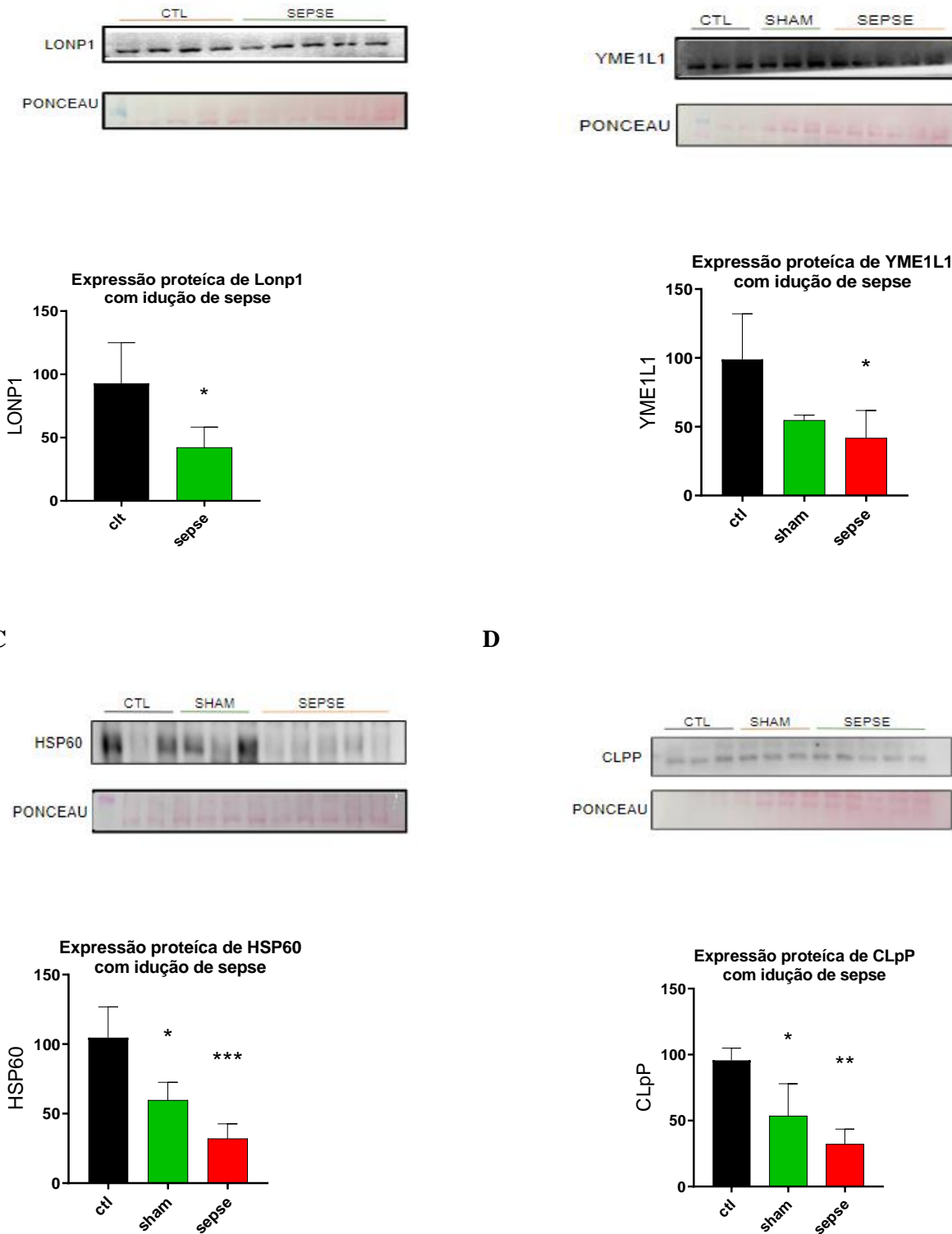
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### Avaliação dos marcadores de UPR mitocondrial na musculatura esquelética dos camundongos

Quando avaliamos LONP1, YME1L1, CLpP e HSP60, é possível perceber que todas essas proteínas se apresentam em menores proporções bem menores nos camundongos que foram induzidos a sepse. HSP60 é uma proteína de choque térmico, responsável por garantir que as proteínas alcancem sua estrutura ideal, durante o quadro de sepse, ela apresentou-se reduzida, corroborando com a hipótese de que neste quadro não ocorreu ativação da UPR mitocondrial (Huang, Li-Ju, et. al., p. 642-648, 2012). A LONP1 por sua vez, é grande responsável por degradar aquelas proteínas que foram mal formadas e, também se apresenta reduzida no quadro de sepse, isso corrobora com a ideia de que ela perde sua função e, também dificulta a ativação da UPRmt (GUO, Q., et.al. p. 1-18, 2022). A CLpP também está reduzida, corroborando com a literatura de que em casos de inflamações graves, a CLpP é inibida pelas proteínas da família das serpinas (PAIVA, R. A., p. 403-412, 2010). Segundo estudos, a YME1L1 está relacionada a Sirt3 e, quando a expressão de Sirt3 é reduzida, há uma diminuição significativa de desacetilação de YME1L1, o que pode levar a disfunção mitocondrial, possivelmente justificando sua diminuição em quadros de sepse. (Jian Y, et. al., 2022).

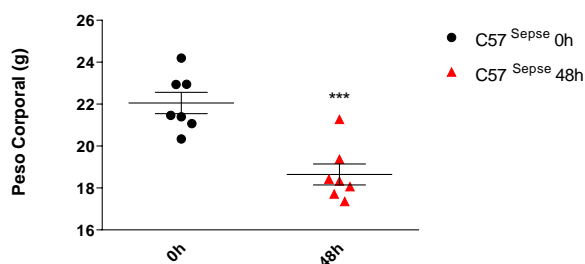
A

B



**Figura 1** - Avaliação do conteúdo proteico das substâncias: (A) Quantidade de proteína LONP1; (B) Quantidade de proteína YME1L1; (C) Quantidade de proteína HSP60; (D) Quantidade de proteína CLpP.

Os animais do grupo sepsis foram pesados antes do procedimento de indução de sepsis e após 48h do protocolo e, foi possível analisar que todos os animais do grupo Sepsis, obtiveram uma perda de peso significativa, corroborando com a hipótese de que a inflamação pode levar ao quadro de caquexia.



**Gráfico 1** – Variação do peso corporal dos camundongos do grupo Sepse ao começo do experimento e 48h após (dia da extração).

Os resultados apresentados nessa sessão ainda estão em fase de análise, portanto eles ainda não são conclusivos.

#### 4. CONCLUSÕES:

Durante a realização do experimento de indução de sepse, foi possível analisar que os animais entraram em um quadro conhecido como caquexia, onde dois dos sintomas (que foram bem perceptíveis) são falta de apetite e redução de força dos animais, isso pode explicar a grande perda de musculatura e peso. Esse quadro analisado em quadros de inflamações graves, pode mostrar quão importante é a função mitocondrial no corpo, uma vez que, quando essas não apresentam atividade normal, podem acarretar em perda de função muscular e, isso essa situação pode levar a pessoa a óbito.

Sobre as proteínas analisadas no projeto até o momento (CLpP, YME1L1, HSP60 e LONP1), todas elas se apresentam diminuída no quadro de septicemia, o que possivelmente está interligado com a literatura, que em casos de inflamações gravíssimas, as mitocôndrias presentes na musculatura esquelética são degradadas, apresentando o mal funcionamento e, por consequência, não há ativação adequada da UPR mitocondrial, impedindo de acontecer o equilíbrio homeostático, levando as pessoas a óbito também.

#### 5. BIBLIOGRAFIA:

1. RUDD, K. E. et al. **Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study**. Lancet, v. 395, n. 10219, p.200-211, 01 18 2020. ISSN1474-547X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31954465> >.>
2. SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. **Sepse: atualidades e perspectivas**. Revista Brasileira de Terapia Intensiva 23: 207-216 p. 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbti/a/gdrF6hVjgcfYc3LWNxxCQS/>>.>
3. COHEN, S.; NATHAN, J.; GOLDBERG, A. **Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies**. Nature Reviews Drug Discovery 14, p. 58-74, 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrd4467#citeas>>
4. Ji LL, Y. **Mitochondrial dysregulation and muscle disuse atrophy**. National Library of Medicine, Faculty Ver – n. 1621, 11 set 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6743252/>>.>
5. SHPILKA, T.; HAYNES, C. **The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing**. Nature Reviews Molecular Cell Biology 19, 109-120 (2018). Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrm.2017.110#citeas>> DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.110>
6. MURI, E. M. F. **Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos**. 2014. (Revisão). Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói RJ. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/VmdG64vRBNnbpHwJSSbM57p/>>.>

7. HUANG, L.; DONG, H.; CHUANG, I.; LIU, M.; YANG, R. **A atenuação da resposta da proteína mitocondrial desdobrada está associada à disfunção hepática em ratos sépticos.** Shock 38(6), p. 642-648, dezembro de 2012. Disponível em: <[https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2012/12000/Attenuation\\_of\\_Mitochondrial\\_Unfolded\\_Protein.11.aspx](https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2012/12000/Attenuation_of_Mitochondrial_Unfolded_Protein.11.aspx)> DOI: 10.1097/SHK.0b013e3182734ff9
8. JIAN Y.; YANG Y.; CHENG L.; YANG X.; LIU H.; LI W.; YANG D. Sirt3 mitigates LPS-induced mitochondrial damage in renal tubular epithelial cells by deacetylating YME1L1. Cell Prolif, fevereiro 2023, 56(2). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9890524/>>. DOI: 10.1111/cpr.13362.
9. GUO, Qiqi et al. **Mitochondrial proteostasis stress in muscle drives a long-range protective response to alleviate dietary obesity independently of ATF4.** Science Advances, [S.L.], v. 8, n. 30, p. 1-18, 29 jul. 2022. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abo0340>. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/epdf/10.1126/sciadv.abo0340>>.
10. PAIVA, Rita Azevedo de; DAVID, Cid Marcos; DOMONT, Gilberto Barbosa. **Proteômica na sepse: estudo piloto.** Revista Brasileira de Terapia Intensiva, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 403-412, dez. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-507x2010000400015>.