



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Bioquímica Médica

Joana da Costa Pinto d'Avila

**Estudo Sobre as Disfunções Mitocondriais na
Sepsis**

Rio de Janeiro

- 2009 -

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Estudo Sobre as Disfunções Mitocondriais na Sepsé

Joana da Costa Pinto d'Avila

Tese apresentada ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Química Biológica.

Orientação: Marcus F. Oliveira & Fernando A. Bozza

Rio de Janeiro
- 2009 -

FICHA CATALOGRÁFICA**D'Avila, Joana da Costa Pinto**

Estudo Sobre as Disfunções Mitocondriais na Sepsis/
d'Avila, Joana da Costa Pinto - Rio de Janeiro: UFRJ/ IBqM,
2009.

ii, 114f

Orientador: Marcus F. Oliveira & Fernando A. Bozza

Tese (doutorado) – UFRJ/ IBqM Programa de Pós
Graduação em Química Biológica, 2009.

Referências Bibliográficas: f.99-113.

1. Infecção 2. Inflamação 3. Metabolismo energético 4.
Macrófagos 5. Monócitos periféricos 6. Cérebro

Estudo Sobre as Disfunções Mitocondriais na Sepsis

Joana da Costa Pinto d'Avila

Tese de doutorado submetida ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Química Biológica

Banca examinadora:

Prof^a Flávia Carvalho Alcantara Gomes
Professor Adjunto/ ICB/ UFRJ

Prof. Wagner Seixas da Silva
Professor Adjunto/ IBqM/ UFRJ

Prof. Felipe Dal Pizzol
Professor/ Universidade do Extremo Sul Catarinense

**Suplente Interno/
Revisor:**

Prof. Robson Queiroz Monteiro
Professor Adjunto/ IBqM/ UFRJ

Suplente Externo:

Prof. Marcelo Torres Bozza
Professor Adjunto/ IMPPG/ UFRJ

Orientadores:

Dr. Fernando Augusto Bozza
IPCEC/ Fiocruz

Prof. Marcus Fernandes de Oliveira
Professor Adjunto/ IBqM/ UFRJ

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese aos meus pais Katia da Costa Pinto d'Avila & Luiz Antonio d'Avila.
Obrigada por investirem na minha educação e me incentivarem a desbravar novos
horizontes.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos meus orientadores Marcus Oliveira e Fernando Bozza pelo constante entusiasmo e incentivo durante o meu doutorado. Obrigada pelo apoio e paciência ao longo desses anos, espero que possamos continuar trabalhando juntos no futuro.

Obrigada também a todos os colaboradores desse trabalho: Ana Paula Santiago, André Japiassú, Antonio Galina, Rodrigo Amâncio e Renata Carnevale. Sem a ajuda de vocês esta tese não seria possível.

Obrigada a todos os membros dos Laboratórios de Bioquímica Redox e de Bioquímica de Artrópodos Hematófagos, especialmente a Maria Clara Nascimento Silva, que junto com os amigos Adriano Sebollela e Caroline Madeira, me ajudaram com a prestação de contas à distância.

Obrigada a minha querida família: meus pais Katia e Luiz Antonio, irmãos Tiago e Eduardo, meu sobrinho José e à Adelaide pelo constante incentivo.

Finalmente, gostaria de agradecer ao Rogério por todo o apoio e carinho desde o início. Você é um exemplo de trabalho e motivação, e o melhor companheiro que a vida poderia me oferecer.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP - difosfato de adenosina

AMP- monofosfato de adenosina

AMPK – proteína cinase ativada por AMP

ATP – trifosfato de adenosina

BHE – barreira hemato-encefálica

CCO – citocromo c oxidase

CD14 – *cluster* de diferenciação 14

CLP – ligação e perfuração cecal

CTE – cadeia transportadora de elétrons

CVO – órgãos circunventriculares

EAS – encefalopatia associada à sepse

FADH₂- dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido

FCCP – carbonil cianeto *p*-trifluoro-metoxi fenilhidrazona

HMGB - *High-mobility group box 1*

IL – interleucina

LPS – lipopolissacarídeo

MIM - membrana interna mitocondrial

mPTP – poro de transição de permeabilidade mitocondrial

NAD – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado

NADH - dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NADPH – fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO – óxido nítrico

PARP – poli (ADP-ribose) polimerase

PBMC – células monocíticas da circulação periférica

RCR – razão do controle respiratório

ROS – espécies reativas de oxigênio

SDOM – síndrome da disfunção orgânica múltipla

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TGF- β - *Transforming growth factor beta*

TLR – receptores da família Toll

TNF – fator de necrose tumoral

UCP – proteína desacopladora

UTI – unidade de terapia intensiva

RESUMO

D'AVILA, Joana da Costa Pinto. Estudo Sobre as Disfunções Mitocondriais na Sepse. Tese (Doutorado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Atualmente a sepse é a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva (UTI) no Brasil e pode ser definida como a resposta inflamatória sistêmica à infecção. A inflamação é um componente central da sepse, influenciando diversos sistemas orgânicos, como o endócrino, o vascular, o imunológico e o metabólico. Disfunções mitocondriais têm sido associadas com a fisiopatologia da sepse, mas a forma como a sinalização inflamatória influencia a função mitocondrial ainda não está clara. O objetivo desta tese foi investigar a utilização de oxigênio e as alterações da função mitocondrial decorrentes da sepse em diferentes modelos.

Iniciamos os estudos com um modelo de cultura de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) *in vitro*. Neste modelo observamos que o estímulo com LPS induz uma progressiva diminuição da razão do controle respiratório (RCR) devido a um aumento precoce (1h) da respiração não associada à síntese de ATP (estado 4). Este fenômeno indica um aumento da permeabilidade da membrana interna mitocondrial a prótons e foi confirmado pelas medidas de alteração da emissão de fluorescência do JC1, considerada um indicador de potencial de membrana mitocondrial.

Em um segundo modelo de estudo investigamos o consumo de oxigênio de monócitos circulantes de pacientes sépticos e observamos uma diminuição do consumo de oxigênio associado à síntese de ATP (estado 3), comparados ao grupo controle de indivíduos não-sépticos. A respiração mitocondrial durante a inibição da F_1F_0 ATP sintase ou desacoplada da síntese de ATP foi idêntica entre os grupos. Estes resultados indicam que disfunções mitocondriais estão presentes nos monócitos de pacientes sépticos e devem ser resultantes de alterações na fosforilação de ADP mitocondrial.

O terceiro modelo utilizado é um modelo de sepse experimental clinicamente relevante (CLP) para estudar a utilização de oxigênio pelo cérebro, um órgão frequentemente afetado na sepse, extremamente dependente de oxigênio, e paradoxalmente deficiente em defesas antioxidantes enzimáticas mitocondriais. As mitocôndrias são a principal fonte de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular e o estresse oxidativo é um componente central de diversas doenças neurológicas. Assim realizamos este estudo com preparações frescas de tecido cerebral de camundongos bem como mitocôndrias isoladas deste tecido durante a sepse. Observamos que a sepse induz o desacoplamento da fosforilação oxidativa no cérebro das cobaias. Além disso, também observamos uma redução no conteúdo de citocromos no cérebro dos camundongos sépticos e diminuição da atividade da citocromo c oxidase.

Assim, concluímos que a indução de disfunções mitocondriais acontece por diferentes mecanismos durante a sepse, dependendo do tipo celular e da natureza do insulto inflamatório. Coletivamente, os resultados desta tese indicam que disfunções mitocondriais são fenômenos que fazem parte da fisiopatologia da sepse e que as vias do metabolismo energético representam alvos terapêuticos seguros e potencialmente eficazes para o tratamento de doenças inflamatórias tais como a sepse.

ABSTRACT

Sepsis is the main cause of death in Brazilian intensive care units (ICU) and is defined as the systemic inflammatory response to an infection. Inflammation is a central component of sepsis that affects other systems, such as endocrine, vascular, immune and metabolic. Mitochondrial dysfunctions have been associated to the pathophysiology of sepsis but how the inflammatory signaling affects mitochondrial function is not clear. The aim of this study was to investigate oxygen consumption and mitochondrial function during sepsis in different models.

We first used cultured macrophages stimulated with lipopolissacaride (LPS). In this model we observed a progressive decrease of the respiratory control rate (RCR) due to an early (1h) increase in the respiration non-associated to ATP synthesis. This means that proton leak through the inner mitochondrial membrane takes place. This phenomenon was confirmed by measurements of JC1 fluorescence emission that is considered an indicator of the mitochondrial membrane potential.

In a second model of study we investigated the mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from septic patients and observed a reduction in oxygen consumption associated to ATP synthesis, compared to the control group of non-septic patients. Mitochondrial respiration during the inhibition of F_1F_0 ATP synthase or uncoupled was identical in both groups. These results show that mitochondrial dysfunctions are present in monocytes from septic patients and might be a result of changes in mitochondrial ADP phosphorylation.

The third model is clinically relevant and was chosen for the study of mitochondrial function in the brain, an organ frequently affected, highly dependent on oxygen and paradoxically with lower levels of enzymatic antioxidant defenses. Mitochondria are main sources of reactive oxygen species and oxidative stress is a central feature of several neurological diseases. We used isolated mitochondria from the septic mice brain as well fresh brain homogenates. Sepsis induced uncoupling of oxidative phosphorylation in the brain. Besides, brain tissue homogenates presented reduced amount of mitochondrial cytochromes and decreased cytochrome c oxidase activity.

We conclude that mitochondrial dysfunctions are present in sepsis by different mechanisms depending on the cell type and the inflammatory insult. Collectively these results indicate that different mitochondrial dysfunctions are induced by sepsis and that mitochondrial pathways of the energy metabolism are a promising and safe therapeutic target in the development of new treatments to sepsis.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1: A resposta inflamatória dependente de citocinas | 15 |
| Figura 2: Vias de transdução da sinalização imunológica da periferia para o cérebro | 19 |
| Figura 3: A resposta inflamatória na sepse | 22 |
| Figura 4: Mecanismos da encefalopatia associada à sepse | 28 |
| Figura 5: Modelo experimental de sepse Ligação e Perfuração Cecal (CLP) | 30 |
| Figura 6: Aspectos básicos da mitocôndria | 35 |
| Figura 7: Representação esquemática do funcionamento da CTE e da fosforilação oxidativa | 39 |
| Figura 8: Os macrófagos ativados com LPS apresentam aumento do consumo de oxigênio no estado 4 | 56 |
| Figura 9: Os macrófagos estimulados com LPS <i>in vitro</i> apresentam uma progressiva diminuição da razão do controle respiratório | 57 |
| Figura 10: A ativação com LPS diminui o potencial de membrana mitocondrial dos macrófagos | 59 |
| Figura 11: A secreção de TNF-α pelos macrófagos estimulados com LPS depende da atividade da CTE mitocondrial | 60 |

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| Resumo | ix |
| <i>Abstract</i> | x |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xi |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1. Considerações gerais sobre a sepse | 13 |
| 1.2. A Imunidade e a Resposta Inflamatória | 14 |
| 1.3. O Controle Neural da Imunidade | 17 |
| 1.4. Fisiopatologia da Sepse | 20 |
| <i>1.4.1. A Resposta Inata e a SIRS</i> | 20 |
| <i>1.4.2. O desbalanço na produção de citocinas</i> | 23 |
| <i>1.4.3. A Síndrome da Disfunção Orgânica Múltipla (SDOM)</i> | 24 |
| 1.5. A Encefalopatia Associada à Sepse | 26 |
| 1.6. Modelos de Estudo | 29 |
| 1.7. A Resposta Metabólica Celular e Sistêmica à Sepse | 31 |
| 1.8. A Mitocôndria e o Metabolismo Energético | 34 |
| <i>1.8.1. A cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa</i> | 38 |
| <i>1.8.2. A formação do potencial de membrana e a síntese de ATP</i> | 40 |
| <i>1.8.3. A geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio</i> | 42 |
| 1.9. A Hipóxia Citopática e a Disfunção Mitocondrial na Sepse | 44 |
| | |
| 2. OBJETIVOS | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 3- METODOLOGIA | 50 |
| 4-RESULTADOS | 54 |
| Parte I. Estudos sobre o efeito do LPS na função mitocondrial de macrófagos RAW 264.7 | 55 |
| Parte II. Estudos sobre a função mitocondrial de monócitos isolados de pacientes sépticos | 61 |
| Parte III. A sepse experimental induz alterações da função mitocondrial no sistema nervoso central de camundongos | 77 |
| 5-DISCUSSÃO | 86 |
| 6- CONCLUSÕES | 98 |
| 7- REFERÊNCIAS | 99 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre a sepse

Atualmente a sepse é a principal causa de morte nas unidades de terapia intensiva (UTI) e uma das principais causas de mortalidade hospitalar tardia, superando o infarto do miocárdio e o câncer (ANGUS, 2001). A mortalidade no Brasil é altíssima chegando a 65% dos casos nas formas mais graves, enquanto a média mundial está em torno de 30-40% (TELES e cols., 2008). Apenas em 2003 foram registrados 398.000 casos e 227.000 mortes relacionadas a sepse no Brasil (<http://www.sepsinet.org/>) e sem uma melhora na estratégia de tratamento este número tende a aumentar devido ao envelhecimento da população, o surgimento de patógenos resistentes, procedimentos cirúrgicos mais complexos e o aumento do contingente de pacientes imunossuprimidos.

A sepse é a resposta inflamatória sistêmica que ocorre após uma infecção e se caracteriza por uma enorme gama de sintomas que incluem alterações da temperatura corporal, da contagem de leucócitos, frequência cardíaca, frequência respiratória e a função orgânica como um todo. Os casos de sepse são classificados hoje de acordo a gravidade do quadro clínico, o que é crucial para a definição de estratégias adequadas de tratamento. A sepse pode se apresentar de três formas progressivamente distintas sob o ponto de vista da gravidade: a **sepse** não-complicada, caracterizada pela presença de dois ou mais dos seus sintomas que incluem hiper ou hipotermia, taquicardia, aumento da frequência respiratória, e contagem de leucócitos acima ou abaixo dos níveis normais; a **sepse grave**, que está associada à disfunção orgânica, acidose metabólica, oligúria e alterações agudas do estado mental; e o **choque séptico**, quando a hipotensão é refratária à reposição de fluidos, com sinais clínicos de hipoperfusão (BONE e cols.,1992).

A interação entre o agente infeccioso e o sistema imune do hospedeiro é complexa e determinante para a evolução da sepse. Tanto as características do agente infeccioso, como fatores de virulência e carga infecciosa, quanto uma resposta inadequada do sistema imune hospedeiro, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da sepse (RUSSEL, 2006). Entretanto, respostas inflamatórias similares à sepse podem ocorrer mesmo na ausência de infecção. A resposta inflamatória sistêmica induzida por agentes não-infecciosos é chamada de **síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)**. A resposta do hospedeiro na sepse e na SIRS é semelhante e pode evoluir para disfunção orgânica e morte. Os mecanismos moleculares envolvidos com SIRS e sepse serão abordados em detalhes mais adiante.

1.2. A Imunidade e a Resposta Inflamatória

O sistema imune é a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores e seu funcionamento apropriado é fundamental para a sobrevivência. Uma característica central da resposta imune é a produção e liberação de citocinas: proteínas produzidas pelas células do sistema imune que orquestram a resposta inflamatória.

As citocinas têm papel central na resposta inflamatória à infecção ou injúria. A resposta mediada por citocinas idealmente funciona como um sistema bem orquestrado e redundante, normalmente bem sucedido na tarefa de erradicar organismos patogênicos invasores e restabelecer a homeostase. Entretanto, se a magnitude ou duração da resposta imune é excessiva, uma série de complicações podem ocorrer (Figura 1).

Citocinas pró e anti-inflamatórias são classes complementares de mediadores que agem em conjunto para assegurar uma resposta imune apropriada. Mediadores pró-inflamatórios incluem TNF, IL-1, IL-6, IL-18, e HMGB1 (dentre outros); mediadores anti-

inflamatórios incluem IL-10, TGF- β , proteína ligadora de TNF além de uma variedade de hormônios e efetores locais (OKE & TRACEY, 2009).

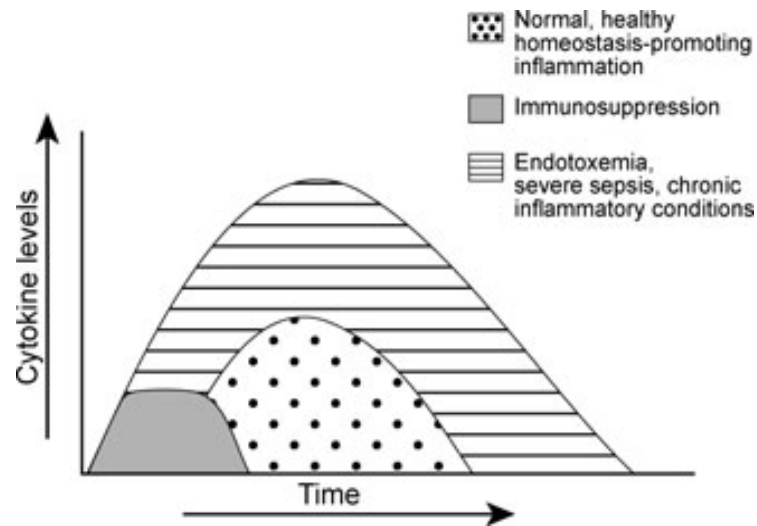


Figura 1: A resposta inflamatória dependente de citocinas. A duração ou intensidade anormal da inflamação resulta em doenças como depressão, febre, anorexia, edema, dor, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, dano tecidual, choque, falência orgânica e morte. O eixo x representa o tempo relativo após o início da resposta inflamatória (TRACEY, 2009).

A imunidade opera classicamente através de dois tipos de resposta: a resposta inata e a resposta adaptativa e os mecanismos de sinalização de ambas são desencadeadas por componentes humorais e celulares. De forma geral, os dois tipos de resposta se distinguem principalmente pela forma como reconhecem os agentes invasores. A resposta adaptativa é a mais recente na evolução e só está presente em organismos vertebrados. Este tipo de resposta envolve o reconhecimento específico de antígenos peptídicos através de receptores localizados na superfície de linfócitos B e T, com produção de anticorpos. A resposta imune inata é considerada mais ancestral e inespecífica, respondendo de forma rápida e eficiente a

uma diversidade de patógenos com os quais não houve contato prévio (FEARON & LOCKSLEY, 1996).

O macrófago é uma das principais células efetoras da resposta inflamatória e do sistema imune. Uma vez ativados, os macrófagos secretam citocinas e outros mediadores imunomoduladores, induzindo a produção de radicais livres, em um conjunto de reações conhecidas como *burst* oxidativo, favorecendo o combate aos agentes infecciosos. O *burst* oxidativo é próprio de células fagocíticas e pode ser definido como um aumento transiente no consumo de oxigênio acompanhado pelo aumento da produção de superóxido não mitocondrial, que funciona como agente bactericida importante para a defesa do organismo contra a infecção (BABIOR e cols., 1973). A NADPH oxidase é a enzima responsável por transferir um elétron da molécula de NADPH para o oxigênio molecular gerando o radical superóxido. A produção de superóxido pode ser para o meio extracelular, como no *burst* oxidativo dos neutrófilos, ou para o meio intracelular, dependendo da isoforma da enzima (SBARRA & KARNOVSKY, 1959; SEGAL & JONES, 1978; ROSSI, 1986; BABIOR, 1999). A NADPH oxidase foi originalmente descrita em neutrófilos, mas foi posteriormente identificada em outros tipos celulares, incluindo células endoteliais e neurônios (JONES e cols., 1996; GRIENDLING e cols., 2000; TEJADA-SIMON e cols., 2005).

A resposta inflamatória no tecido cerebral envolve a ativação de células da glia, mais especificamente astrócitos e microglia. As microglias são a população de macrófagos residentes do tecido cerebral. Assim como os macrófagos periféricos, a microglia também se torna ativada durante a inflamação (KALTSCHMIDT e cols., 1994). Esta mudança para um fenótipo pró-inflamatório tem um papel sinalizador e adaptativo mas dependente da magnitude do insulto inflamatório, a ativação da microglia pode ser deletéria para os neurônios (HANISH & KETTENMANN, 2007). Os astrócitos são a população de glia majoritária do tecido cerebral, e também se tornam ativados em resposta a uma série de

patologias do sistema nervoso central, um fenômeno conhecido como gliose reativa. Os astrócitos têm um importante papel regulador de uma série de funções cerebrais, por exemplo, as sinapses e do metabolismo neuronal (PEKNY & NILSSON, 2005).

1.3. O Controle Neural da Imunidade

Estudos recentes têm apontado um papel central de circuitos neurais como moduladores da resposta inflamatória. Sabe-se que os órgãos linfóides do sistema imune são inervados por neurônios colinérgicos, catecolaminérgicos e outros. O conceito de “reflexo inflamatório” define o mecanismo pelo qual os potenciais de ação originados em neurônios modulam continuamente o sistema imune. Neurotransmissores interagem com células do sistema imune e propagam a informação essencial que regula a magnitude da resposta do hospedeiro à infecção e a manutenção da homeostase (TRACEY, 2009).

Recentemente descobriu-se que o sistema imune pode ser regulado pela atividade do nervo vago. O estímulo deste nervo libera acetilcolina que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e outras células produtoras de citocinas, diminuindo a inflamação. A indução de circuitos neurais colinérgicos através da estimulação elétrica do nervo vago ou da administração de agonistas de receptores colinérgicos já se demonstrou benéfica em modelos de sepse, isquemia, hemorragia e outros (HUSTON e cols., 2007; TRACEY, 2002).

As vias de sinalização da inflamação periférica para o cérebro podem ser neurais ou humorais (SHARSHAR e cols., 2004). Uma das vias neurais (Figura 2a) envolve a atividade aferente do nervo vago, que funciona como um sensor visceral da inflamação durante infecções abdominais e viscerais. O nervo vago possui receptores de citocinas e de padrões moleculares de patógenos em seu axônio que se projeta para os núcleos do trato solitário,

parabranquial, supraóptico, paraventricular hipotalâmico, *stria terminalis*, amígdala, substância cinzenta periaquedutal e medula ventrolateral (DANTZER e cols., 2008). A ativação desta via neural provavelmente sensibiliza estas estruturas cerebrais de forma a propagar o sinal inflamatório.

Os órgãos circunventriculares e o plexo coróide estão localizados no sistema nervoso central em sítios desprovidos de barreira hemato-encefálica (Figura 2b) e expressam constitutivamente proteínas importantes no reconhecimento de patógenos como TLR (LAFLAMME & RIVEST, 2001), CD14 (LACROIX e cols. 1998) e receptores de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (NADEAU & RIVEST, 1999; CUNNINGHAM, 1992; VALLIERES & RIVEST, 1997). O plexo coróide consiste de um tapete de capilares que cobre as células endoteliais dos ventrículos. Estas células são responsáveis pela produção do liquor. A ativação de TLR presentes nos órgãos circunventriculares induz a produção e liberação de citocinas no sistema nervoso central (SIAMI e cols., 2008).

A expressão de receptores de IL-1 já foi detectada em neurônios piramidais do hipocampo e na glândula pituitária anterior (PARNET e cols., 2002). Além disso, macrófagos perivasculares e células endoteliais das vênulas cerebrais possuem receptores de IL-1 e a ativação destes receptores por citocinas circulantes resulta em produção local de prostaglandinas (KONSMAN, 2004; SCHILTZ, 2002). A propagação destas vias de sinalização para o cérebro leva a ativação da microglia e secreção de citocinas pró-inflamatórias no parênquima cerebral. Além das observações clínicas, estudos em modelos animais mostram que existe uma conexão entre a produção de citocinas no sistema nervoso central e o comportamento associado a doença e depressão (DANTZER e cols., 2008). A forma como a sinalização inflamatória influencia a função cerebral é alvo de intensa pesquisa, e ainda não está claro se a disfunção cerebral é causa ou consequência da sepse (SHARSHAR e cols., 2005).

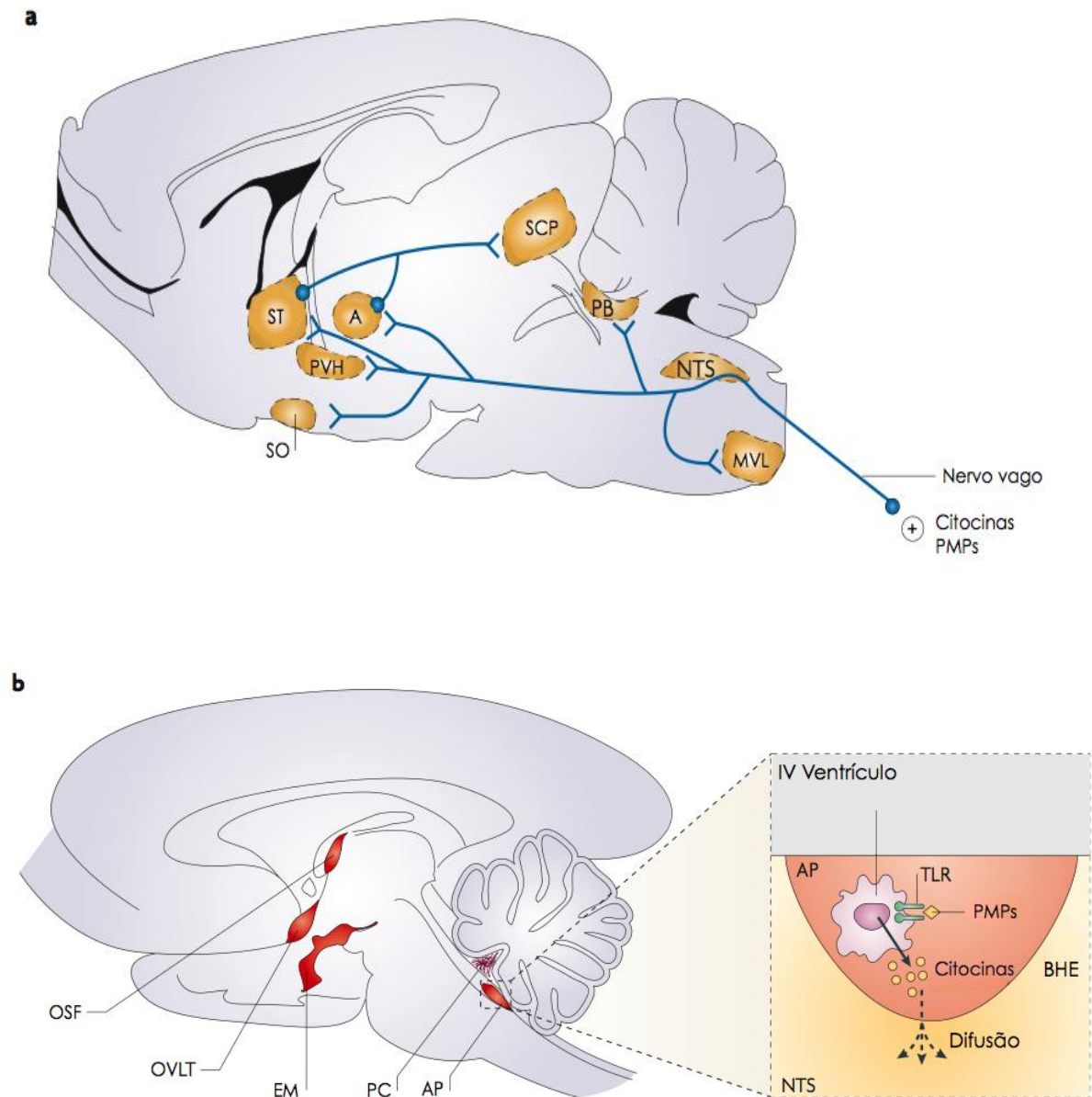


Figura 2: Vias de transdução da sinalização imunológica da periferia para o cérebro (aférentes). **A)** via neural de ativação do nervo vago através de receptores de citocinas e de padrões moleculares de patógenos (PMPs) em seu axônio que se projeta para os núcleos do trato solitário (NTS), parabranquial (PB), supraótico (SO), paraventricular hipotalâmico (PVH), *stria terminalis* (ST), amígdala (A), substância cinzenta periaquedutal (SCP) e medula ventrolateral (MVL). **B)** via humoral onde PMPs circulantes chegam ao cérebro através do plexo coróide (PC) e dos órgãos circunventriculares (CVOs) que incluem a eminência média (EM), *organum vasculosum* da lamina terminalis (OVLTL), área postrema (AP) e órgão supraforneal (OSF). A figura mostra em destaque o NTS focando a ligação de PMPs aos TLR de células semelhantes a macrófagos com liberação de citocinas que podem se difundir através dos CVOs para o cérebro (Adaptado de DANTZER e cols., 2008).

Em suma, o sistema nervoso regula a resposta inflamatória em tempo real, da mesma forma que controla a frequência cardíaca e outras funções vitais. O arco aferente do sistema vagal funciona como um sensor de injúria ou infecção periférica que sinaliza para o sistema nervoso central a presença de uma inflamação sistêmica. Em contrapartida esta sinalização ativa circuitos neurais eferentes, incluindo a via anti-inflamatória colinérgica que modula a resposta imunológica e a progressão das doenças inflamatórias (TRACEY, 2002, 2007 e 2009).

1.4. Fisiopatologia da Sepses

1.4.1. A Resposta Inata e a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

De forma geral, o curso da sepsis pode ser dividido em duas fases distintas: a fase inicial, extremamente pró-inflamatória, hipermetabólica e hiperdinâmica e a fase tardia, caracterizada por uma profunda imunossupressão, hipometabolismo e hipotensão (HOTCHKISS & KARLICK, 2003). Durante a sepsis, inicialmente há ativação das células do sistema imune – neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos – seguida de uma diminuição da atividade destas células que gera imunossupressão e aumento do risco de super-infecção (ABRAHAM & SINGER, 2007).

A resposta inflamatória sistêmica é iniciada pelo reconhecimento de padrões moleculares por receptores do sistema imune inato. Estes receptores reconhecem padrões moleculares altamente conservados de microrganismos, e são chamados receptores da família Toll (*Toll-like receptor*, TLR). A ativação destes receptores por epítopos de microrganismos indica a presença de patógenos, e rapidamente dá início à resposta imune inata do hospedeiro, como ilustrado na Figura 3. A ligação de padrões moleculares associados à patógenos, como o

componente lipopolissacarídeo (LPS) de parede de bactérias Gram-negativas, ao TLR presente na membrana plasmática de leucócitos, dispara uma cascata de sinalização intracelular que culmina com o aumento da transcrição de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL) como IL-1, IL-6 e IL-12 (Figura 3). Estas são citocinas pró-inflamatórias importantes para a resposta do hospedeiro à infecção, mas caso sejam produzidas em excesso ou inadequadamente podem contribuir para a injúria tecidual. IL-10 tem ação anti-inflamatória e é uma das principais citocinas envolvidas na imunossupressão durante a sepse (RUSSEL, 2006).

Em paralelo à ativação de células do sistema imune, há também um aumento da atividade da Óxido Nítrico Sintase endotelial (*endothelial Nitric Oxide Sintase*, eNOS), aumentando a produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais (Figura 3). O NO é um potente vasodilatador endógeno (VALLANCE e cols., 1989) sendo considerado um mediador chave no choque séptico (RUSSEL, 2006, GÓMEZ-JIMÉNEZ e cols., 1995). O NO também está envolvido na neurodegeneração inflamatória induzida por células da glia ativadas (BAL-PRICE & BROWN, 2001), além modular a função mitocondrial associada tanto à apoptose quanto ao metabolismo energético em diferentes tipos celulares (BAL-PRICE & BROWN, 2001; BORUTAITE e cols., 2001; MONCADA & ERUSALIMSKY, 2003).

A infecção também estimula a resposta humoral e o sistema imune adaptativo. A ativação dos TLR leva não só a indução da resposta inata, mas também ao desenvolvimento da imunidade adaptativa antígeno-específica. A ligação do LPS ao TLR-4, por exemplo, estimula a síntese de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , que além de induzirem a resposta inflamatória aguda, promovem o desenvolvimento e crescimento de células T *helper* que vão orquestrar a resposta imune adaptativa (FEARON & LOCKSLEY, 1996). Quando o patógeno alcança a corrente sanguínea, encontra elementos humorais como as

imunoglobulinas e o sistema complemento. A ativação direta do sistema complemento, mediada ou não pela deposição de imunoglobulinas, leva a opsonização do patógeno com fragmentos do sistema complemento e conseqüente remoção por fagócitos (DAVID-NETO, 2007).

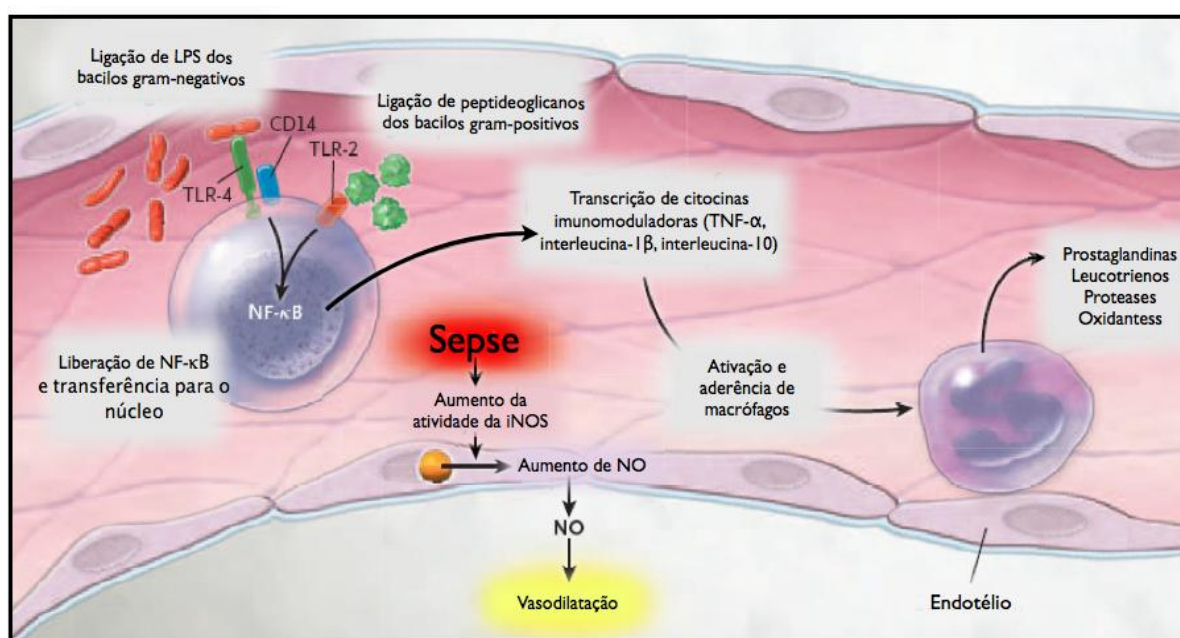


Figura 3: A resposta inflamatória na sepse. O esquema mostra o início da resposta inflamatória, que se inicia com a ligação de padrões moleculares de patógenos (p.ex. lipopolissacarídeo, LPS) aos receptores do tipo Toll (TLR), formando um complexo com a proteína CD14 que ativa uma cascata de sinalização intracelular envolvendo a ativação e translocação do fator de transcrição NF-κB para o núcleo e culminando com a transcrição de citocinas imunomodulatórias, como TNF-α, IL-1β e IL-10. A sepse induz também a produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais, sendo estes ativadas por citocinas e expressando mais moléculas de adesão, induzindo a ligação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e plaquetas à superfície do endotélio. Proteases, espécies reativas de oxigênio, prostaglandinas e leucotrienos danificam as células endoteliais levando ao aumento da permeabilidade endotelial, vasodilatação e alteração da coagulação (Adaptado de RUSSEL, 2006).

1.4.2. O Desbalanço da Produção de Citocinas

Uma característica essencial da sepse é um desbalanço na produção de mediadores inflamatórios (BOZZA e cols., 2007) que afeta diversos outros sistemas orgânicos, como o sistema cardiovascular, o sistema complemento e a cascata de coagulação (NIESSEN e cols., 2008), causando uma série de efeitos adversos citotóxicos, metabólicos e hemodinâmicos.

A coagulação intravascular disseminada é uma das complicações mais graves que pode ocorrer durante a sepse. A produção de fibrina é característica da sepse e pode ser tanto intravascular quanto extravascular (PRESTON e cols., 1973; IDELL, 1994). A coagulação intravascular é caracterizada por trombose intravascular difusa na microvasculatura (DIXON, 2004) o que contribui para a lesão isquêmica (LEVI, 2004). A deposição de fibrina nos alvéolos pulmonares é um exemplo de geração extravascular de fibrina e é um fator chave no desenvolvimento da injúria pulmonar aguda na sepse (IDELL, 1994; WELTY-WOLF e cols., 2001). A ativação da coagulação na sepse é iniciada pela via do Fator Tecidual (TF) (HACK, 2000). Em modelos animais de sepse o bloqueio do TF atenua a coagulação e previne a morte (TAYLOR e cols., 1991; WANG e cols., 2008)

Novas citocinas envolvidas na fisiopatologia da sepse continuam a ser identificadas, como por exemplo, a *high mobility group box protein-1* (HMGB-1) (WANG e cols., 2004; YANG e cols., 2005). Os níveis de HMGB-1 circulantes permanecem elevados por longos períodos em pacientes sépticos (YANG e cols., 2005) e o bloqueio desta proteína em modelos experimentais de sepse, mesmo após 24h do início da infecção, aumenta a sobrevivência dos animais (YANG e cols., 2004).

1.4.3. A Síndrome da Disfunção Orgânica Múltipla (SDOM):

A resposta imune necessária para erradicar a infecção pode ser deletéria para o hospedeiro, destruindo células do parênquima e culminando em disfunção orgânica. Por exemplo, em infecções localizadas como pneumonia ou em injúrias teciduais extensas, a arquitetura do tecido normal pode chegar a ser quase completamente substituída por células inflamatórias e *debris* celulares. Inicialmente, o dano celular é restrito a área da infecção, mas pode evoluir de forma sistêmica na sepse grave, causando danos em locais distantes do sítio infeccioso ou injúria tecidual primária. Assim, a resposta inflamatória sistêmica pode desencadear um quadro clínico conhecido como **síndrome da disfunção múltipla de órgãos (SDOM)** que é a principal causa de morte de pacientes sépticos. A SDOM pode ser definida como a deterioração da função de múltiplos órgãos, sendo os mais afetados pulmões, fígado e rins. Pacientes vítimas de sepse, traumas e outras doenças críticas podem desenvolver SDOM, onde os órgãos afetados não são necessariamente aqueles onde houve o insulto original. As manifestações clínicas mais comuns da SDOM incluem hipoxemia, diminuição da complacência pulmonar, icterícia, oligúria e azotemia. Manifestações no sistema nervoso central também são comuns, e podem variar desde alterações sutis do estado mental ao coma. Distúrbios da função gastrointestinal incluindo perda da peristalse também são comuns (FINK & EVANS, 2002).

Os mecanismos envolvidos na SDOM são mediados pela liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores resultando na expressão de receptores endoteliais e aderência de neutrófilos (REDL e cols.1991; MUNRO e cols., 1991), contribuindo diretamente para a coagulação intravascular e a estimulação de macrófagos residentes do fígado, rins, pulmões e outros órgãos, gerando os sintomas característicos da SIRS.

A falência orgânica na SDOM é atribuída ao excesso de mediadores inflamatórios gerando alterações circulatórias que resultam em hipóxia tecidual e morte celular. No entanto neste caso a falência orgânica seria irreversível, o que não é frequentemente observado. De uma forma geral, os exames de autópsia de pacientes que morrem com sepse e SDOM não demonstram sinais de dano tecidual extenso em órgãos frequentemente afetados como fígado, rins e pulmões (HOTCHKISS e cols., 1999). O mesmo ocorrendo em modelos animais de sepse (BREALEY, 2004). Um estudo de autópsias com detecção histológica de células do sistema imune mostrou que há muito menos linfócitos e células dendríticas em tecidos de pacientes que morreram com sepse do que em órgãos de pacientes que morreram com trauma (HOTCHKISS & KARLK, 2003). Outro estudo que utilizou um modelo animal de sepse clinicamente relevante observou que, assim como a sepse em humanos, a severidade da disfunção orgânica estava associada ao aumento da produção de NO e maior disfunção mitocondrial em órgãos como fígado e músculo esquelético. Também não observaram sinais histológicos de morte celular sugerindo que a disfunção orgânica induzida pela sepse tem origem no metabolismo energético e que uma inibição programada da função celular pode ser um mecanismo de adaptação e sobrevivência à inflamação (BREALEY e cols., 2004). Estes dados sugerem que a falência orgânica observada na SDOM é resultado de disfunções teciduais e celulares e não de alterações estruturais, sendo assim potencialmente reversível.

Apesar do quadro inicial da sepse e da SIRS ser extremamente pró-inflamatório, uma série de testes clínicos randomizados e controlados direcionados contra mediadores pró-inflamatórios falharam em reduzir a mortalidade da sepse de forma significativa (RUSSEL, 2006). Com isso, o foco da terapia intensiva se voltou um pouco mais para a resposta anti-inflamatória na sepse que, descontrolada, também pode ser deletéria gerando uma profunda imunossupressão. O quadro de imunossupressão associado a sepse se caracteriza por uma perda funcional do sistema imune no sentido de resposta a um estímulo infeccioso.

Recentemente, Peck e colaboradores realizaram um estudo avaliando a capacidade fagocítica e secreção de citocinas por macrófagos estimulados com soro de pacientes sépticos, e mostraram que a secreção de IL-10 pelos macrófagos ativados com soro de pacientes foi maior com o grupo de não-sobreviventes e a capacidade fagocítica foi maior com o grupo dos sobreviventes. Com isso os autores concluíram que marcadores anti-inflamatórios são predominantes em tipos de sepse mais graves, indicando que o fenótipo anti-inflamatório está relacionado à maior mortalidade na sepse (PECK e cols., 2009). Autópsias de pacientes não – sobreviventes `a sepse mostram que existe morte de células do sistema imune, especificamente linfócitos B, linfócitos T CD4+ e células dendríticas, mesmo na presença de um agente infeccioso enquanto o paciente ainda estava vivo, caracterizando o quadro de imunossupressão (HOTCHKISS & KARL, 2003).

1.5. A Encefalopatia Associada à Sepse

Mais de 50% dos pacientes sépticos desenvolvem algum grau de encefalopatia durante o tratamento na unidade de terapia intensiva (PERL e cols., 1995). A **encefalopatia associada à sepse (EAS)** é frequentemente uma das primeiras manifestações clínicas da sepse e está associada à mortalidade dos pacientes (PAPADOPOULOS e cols., 2000). Alguns estudos mostram que sobreviventes de sepse podem desenvolver déficits cognitivos e doenças psiquiátricas como depressão, ansiedade e transtorno pós-traumática. Sequelas neurológicas após a sepse são comuns, podem ser permanentes e estão associadas com a diminuição da qualidade de vida e da capacidade de trabalho (HOPKINS & JACKSON, 2006). Do ponto de vista clínico agudo, a encefalopatia leva a um quadro de *delirium*, caracterizado por alterações comportamentais, cognitivas e do nível de consciência de caráter potencialmente reversível (SIAMI e cols., 2008).

A EAS é considerada um fenômeno agudo, difuso e reversível (YOUNG e cols., 1990). Entretanto é possível que os distúrbios psicológicos e cognitivos sejam consequência de lesões cerebrais agudas provocadas pela sepse. As consequências desta disfunção cerebral ainda estão sendo estabelecidas, no entanto há evidências crescentes que a presença de uma disfunção autonômica central contribua para as alterações hemodinâmicas encontradas nos pacientes com choque séptico, o que pode explicar a associação entre EAS e a mortalidade dos pacientes sépticos. De fato, um estudo realizado com cérebros de pacientes sépticos *post mortem* mostrou a presença de hemorragia, hipercoagulopatia, micro-abcessos e lesões isquêmicas em núcleos autonômicos centrais (SHARSHAR e cols., 2004). Este estudo mostrou uma maior frequência de lesões isquêmicas e apoptose neuronal nos centros autonômicos do pacientes sépticos. Os autores ainda observaram um aumento da expressão da eNOS nos vasos sanguíneos dos núcleos autonômicos centrais que pode estar envolvido com as disfunções hemodinâmicas do choque séptico (SHARSHAR e cols., 2004).

A patogênese da EAS não é totalmente conhecida, vários mecanismos já foram propostos e estão ilustrados na Figura 4: i) a invasão de componentes bacterianos que exerçam efeito direto sobre o sistema nervoso central, ii) a isquemia como consequência da redução global ou local do fluxo sanguíneo cerebral ou o aumento do consumo de oxigênio cerebral (MAEKAWA, 1991; PAPADOPOULOS, 2000), iii) a quebra da barreira hematoencefálica (JEPPSSON, 1981; PAPADOPOULOS, 1999; BOZZA e cols., 2009), iv) processos inflamatórios induzindo a ativação de microglias, com produção de citocinas, expressão de NOS e morte celular (SHARSHAR, 2004; SEMMLER e cols., 2005), v) o estresse oxidativo (TAKEZAWA e cols., 1983; VOIGT e cols., 2002; BARRICHELLO e cols., 2006), vi) as alterações no metabolismo cerebral afetando os níveis de aminoácidos, de neurotransmissores serotoninérgicos e noradrenérgicos, e as alterações nos níveis de cálcio (KADOI e cols., 1996, SOEJIMA, 1990; FREUND, 1985; FREUND, 1979; ZHAN, 1996) e vii) os distúrbios

metabólicos sistêmicos resultantes de SDOM e agentes terapêuticos, especialmente a falência renal e hepática (KUNZE, 2002).

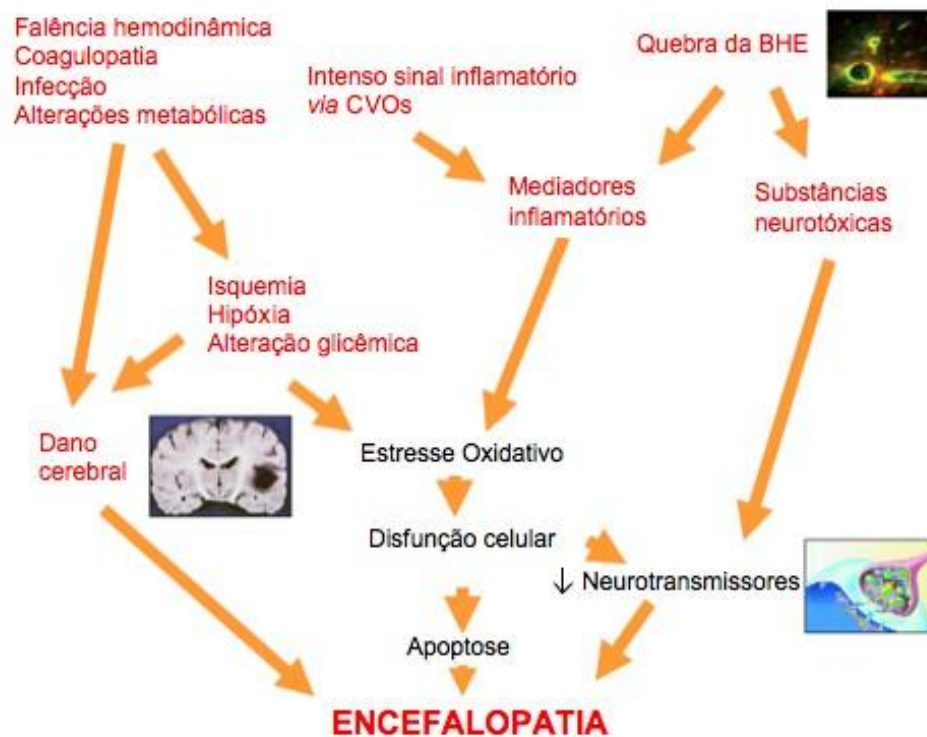


Figura 4: Mecanismos da encefalopatia associada à sepse. Esquema destacando os possíveis mecanismos de estabelecimento da encefalopatia associada à sepse. Durante a inflamação sistêmica uma série de fatores, como alterações metabólicas e a quebra da BHE, podem gerar estresse oxidativo, disfunção e morte celular no sistema nervoso central. CVOs - órgãos circunventriculares, BHE - barreira hemato-encefálica (Adaptado de SIAMI e cols., 2008).

1.6. Modelos de Estudo

Existem diversos modelos experimentais de sepse que variam bastante entre si em complexidade e gravidade dos sintomas quando comparados a sepse humana. Os modelos mais simples envolvem a injeção de toxinas bacterianas ou bactérias vivas em cobaias por diferentes vias: intraperitoneal, intravenosa ou intratecal. Nestes modelos há um forte estímulo da resposta imune inata com produção de citocinas. Entretanto este aumento é transiente e muitas vezes em magnitude muito maior do que na sepse humana, onde o aumento na produção de citocinas acontece de forma mais lenta e prolongada (REMICK e cols., 2000). Assim como a administração de toxinas bacterianas, a administração de bactérias vivas também é um modelo controlado e reprodutível em laboratório, mas consegue reproduzir apenas em parte os sintomas da sepse humana. Outros modelos mais complexos e por isso mais relevantes clinicamente incluem a **ligação e perfuração cecal (CLP)**, ilustrado na figura 5, que mimetiza a peritonite fecal (WICHTERMAN e cols., 1980).

O modelo de sepse causado por CLP é considerado o melhor modelo experimental de sepse por conseguir reproduzir em laboratório grande parte das alterações imunológicas, hemodinâmicas e bioquímicas observadas na sepse humana. Enquanto que os modelos de endotoxemia geram um quadro essencialmente hipodinâmico caracterizado por redução do débito cardíaco e queda da pressão arterial com aumento da resistência vascular periférica, o modelo de CLP apresenta aumento do débito cardíaco associado à hipotensão, com diminuição da resistência vascular característicos da fase hiperdinâmica, semelhante ao que acontece na sepse humana. Entretanto, o CLP sem nenhum tipo de tratamento do foco infeccioso resulta em um modelo clínico mais parecido com uma peritonite fecal mal resolvida. A utilização do CLP com reposição volêmica apropriada e/ou terapia adjuvante,

torna este modelo clinicamente mais relevante e por isso foi o modelo escolhido para os estudos desta tese (DEITCH, 2005).

Ligação e perfuração cecal

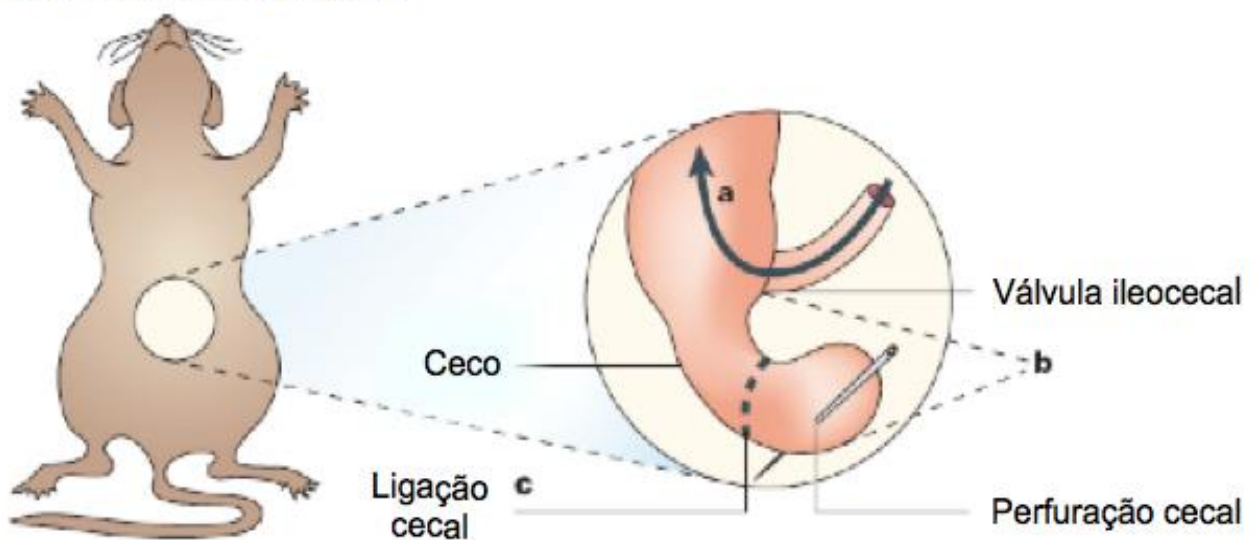


Figura 5: Modelo experimental de sepse por Ligação e Perfuração Cecal (CLP). O procedimento cirúrgico de laparotomia e exposição das alças intestinais são realizados com o animal anestesiado. A seta azul indica a válvula íleo-cecal que fica na junção entre o intestino delgado e grosso (a). No modelo CLP a ligação do ceco não causa obstrução do intestino grosso (c). A perfuração do ceco faz extravasar o conteúdo fecal na cavidade peritoneal, normalmente estéril (b). O animal recebe reposição de fluidos com injeção de salina fisiológica e pode receber terapia adjuvante com antibióticos. A mortalidade depende da quantidade de conteúdo fecal extravasado determinado pelo número de perfurações no ceco (Adaptado de BURAS e cols., 2005).

Parte das alterações cognitivas observadas em pacientes com EAS já foi documentada também em modelos animais de sepse experimental induzida por CLP, onde foi observado déficit cognitivo secundário às alterações do sistema nervoso central durante a sepse (BARICHELLO e cols., 2005). Foi demonstrado o acúmulo precoce de produtos de peroxidação lipídica e de carbonilação de proteínas no cérebro, oriundo de um estresse oxidativo neste modelo de CLP em ratos (BARICHELLO e cols., 2006). Mais recentemente foi mostrado que o tratamento com antioxidantes reverte a disfunção mitocondrial (ZAPELINI e cols., 2008) e previne o déficit de memória tardio em um modelo de CLP em ratos (BARICHELLO e cols., 2007). Assim, acredita-se que o estresse oxidativo no sistema nervoso central desempenhe um papel importante no desencadeamento da EAS (DALPIZZOL e cols., 2009).

1.7. A Resposta Metabólica Celular e Sistêmica à Sepse

A homeostase requer uma interação balanceada entre o sistema nervoso central, o sistema endócrino e o sistema imune. O avanço da pesquisa básica mostra hoje que a interação entre os sistemas orgânicos é íntima e interdependente, sendo cada vez mais difícil olhar para cada um separadamente. A compreensão da complexidade de interações entre estes sistemas oferece um desafio à comunidade científica, mas é um caminho para o entendimento da fisiopatologia de doenças como a sepse e assim gerar terapias mais eficazes.

A resposta de fase aguda às doenças críticas como a injúria tecidual, proveniente de um trauma ou da sepse, envolve a ativação da resposta orgânica ao estresse com a secreção de uma série de hormônios incluindo cortisol, hormônios adrenocorticotróficos, catecolaminas, vasopressina, glucagon e hormônios do crescimento. O conjunto da ação destes hormônios ajuda a manter a circulação e a oxigenação tecidual aumentando a disponibilidade de

substratos energéticos como glicose, ácidos graxos e aminoácidos que são mobilizados dos estoques corporais como o fígado e o músculo, com o objetivo de aumentar a síntese de ATP e manter o balanço energético. Mais tardiamente no curso da doença crítica, o perfil hormonal é totalmente alterado, sendo caracterizado de forma geral por uma supressão hormonal, incluindo os hormônios da tireóide e o eixo hipotálamo-hipofisário, com exceção do cortisol que ainda pode se manter em altas concentrações. Os hormônios da tireóide têm papel fundamental no controle do metabolismo energético sendo fundamentais para o crescimento e desenvolvimento normais (VANHOREBEEK e cols., 2006).

A resposta metabólica à injúria tecidual e à sepse é caracterizada por um aumento da taxa metabólica basal e do catabolismo de proteínas e de lipídeos, balanço de nitrogênio negativo, hiperglicemia e aumento da produção de glicose hepática, associados a uma progressiva perda de massa corporal. Há um aumento do catabolismo de proteínas de forma generalizada, cujos efeitos mais pronunciados são a perda de massa muscular (KINNEY, 1995). Citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α estimulam diretamente o catabolismo de proteínas ativando a via de ubiquitina-proteassoma de degradação de proteínas, além de indiretamente estimularem o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal, o que leva ao aumento da secreção de glicocorticoides. Os aminoácidos liberados na corrente sanguínea são utilizados pelo fígado para a síntese de proteínas de fase aguda e gliconeogênese (CHIOLERO, 1997).

Em condições aeróbicas onde cerca de 90% do gasto energético está associado a processos oxidativos há uma forte correlação entre a taxa metabólica basal e o consumo de oxigênio. O transporte de oxigênio sistêmico (DO_2) reflete o fluxo de oxigênio para os tecidos e é dependente do conteúdo arterial de oxigênio e do débito cardíaco. Quando o transporte de oxigênio diminui, o consumo de oxigênio (VO_2) é inicialmente mantido por mecanismos compensatórios - aumento do débito cardíaco e da extração de oxigênio tecidual - observados na fase inicial da sepse. Entretanto, abaixo do nível crítico há uma redução

concomitante tanto do consumo de oxigênio quanto da produção de ATP, por exemplo, na hemorragia aguda ou no choque séptico com a extrema redução da perfusão tecidual (CHIOLÉRO, 1997).

A gravidade da sepse se correlaciona com a diminuição progressiva do consumo de oxigênio tecidual (KREYMANN e cols., 1993) que resulta num aumento da tensão de oxigênio tecidual (BOEKSTEGERS e cols., 1991), apontando para uma redução da capacidade de utilização de oxigênio pelas células como um mecanismo essencial da supressão metabólica associada à sepse. De fato a função mitocondrial tem papel central em uma série de condições fisiopatológicas, e diversos tipos de disfunções mitocondriais têm sido associados com a fisiopatologia da sepse e outras condições como hemorragia e trauma. Maiores detalhes sobre disfunções mitocôndrias durante a inflamação serão discutidos adiante.

1.8. A Mitocôndria e o Metabolismo Energético

A habilidade de adquirir energia a partir de diversas fontes e de transformar esta energia em trabalho é fundamental para a sobrevivência de todos os seres vivos. Ao longo da evolução, os organismos desenvolveram algumas formas de armazenar e transformar energia através de compostos de alta energia, como ATP e fosfocreatina. A oxidação de carboidratos e lipídeos é a principal fonte de energia em mamíferos. Aminoácidos também são bons substratos para o metabolismo oxidativo, entretanto necessitam sofrer uma reação de deaminação para entrar na via sob a forma de carboidratos.

A mitocôndria é a organela responsável pelo aproveitamento da maior parte da energia livre oriunda da oxidação dos nutrientes em células eucarióticas, realizado este processo através do ciclo de Krebs, do fluxo de elétrons na cadeia transportadora e da fosforilação oxidativa (SARASTE, 1999). As mitocôndrias são organelas complexas cuja função engloba um amplo espectro de processos biológicos além da síntese de ATP, como a síntese de outras importantes biomoléculas como o heme (ATAMNA, 2004), o colesterol (STOCCO, 2000) e aminoácidos, participa da sinalização de vias de apoptose (GOGVADZE e cols., 2006) e da geração de espécies reativas de oxigênio (SKULACHEV, 2006). Possui uma organização estrutural interessante (figura 6), apresentando duas membranas distintas: uma externa composta por fosfolípidios e proteínas e uma interna, contendo além de fosfolípidios e cardiolipina uma grande quantidade de proteínas (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Destaca-se nesta complexa organização estrutural, a enorme área da membrana interna em relação à externa, resultando na formação de inúmeras invaginações da membrana interna, formando as chamadas cristas mitocondriais. Além disso, a presença destas duas membranas delimita uma região entre elas extremamente importante, chamada de espaço intermembranas,

enquanto a parte mais interna desta organela, a matriz mitocondrial, contém inúmeras enzimas como as do ciclo de Krebs, da beta-oxidação, etc (figura 6).

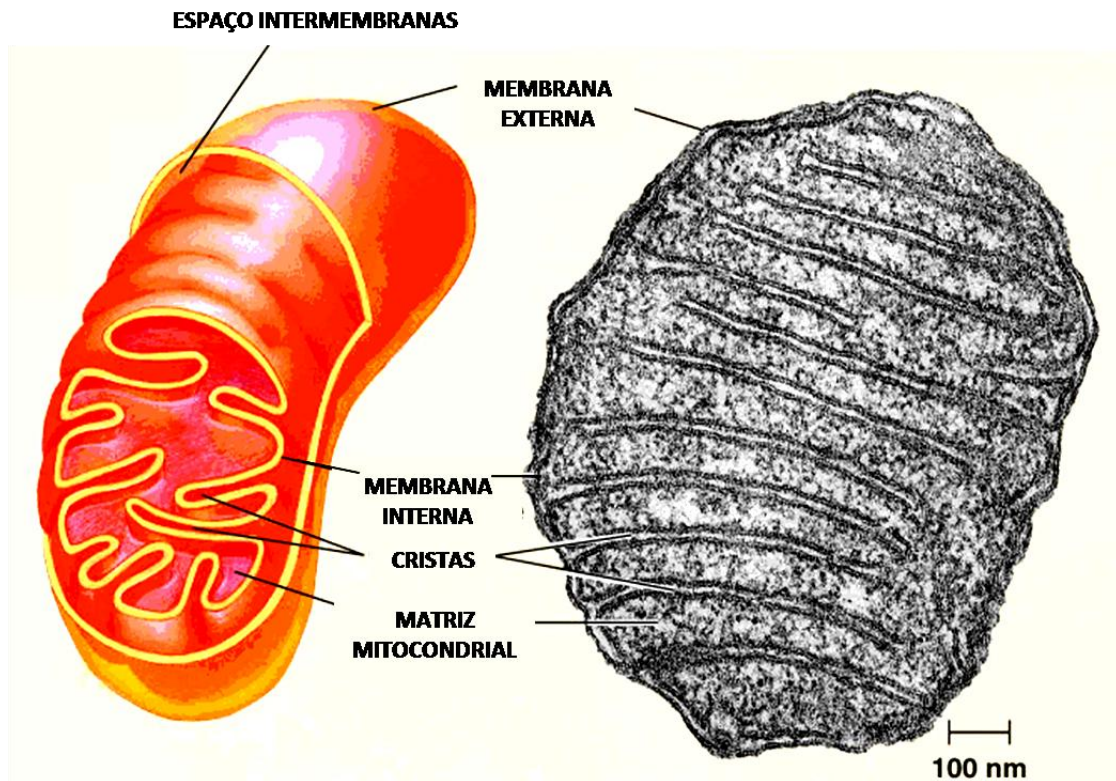


Figura 6: Aspectos básicos da mitocôndria. À direita observa-se uma microscopia eletrônica de transmissão de um corte transversal de uma mitocôndria e à esquerda observa-se uma representação esquemática dos compartimentos mitocondriais.

1.8.1. A cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa:

A fosforilação oxidativa ocorre na membrana interna mitocondrial (MIM) através da cadeia transportadora de elétrons (CTE) por intermédio de compostos capazes de realizar reações de oxi-redução, como, a ubiquinona, os centros ferro-enxofre e os citocromos. A maior parte destes compostos, com exceção da ubiquinona, faz parte de grandes multímeros proteicos que compõem os chamados complexos mitocondriais. A figura 7 mostra uma representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons e da síntese de ATP mitocondrial.

O complexo I (NADH-ubiquinona oxido redutase) é um enorme multímero proteico com cerca de 50 polipeptídeos contendo uma flavoproteína e proteínas com centros ferro-enxofre (SHARMA e cols., 2009). O complexo I é um dos aceptores de elétrons da CTE, recebendo dois elétrons da oxidação da molécula de NADH oriunda do ciclo de Krebs, transferindo-os para a molécula de ubiquinona (Q). Concomitante ao transporte de elétrons no complexo I, ocorre o transporte de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). A ubiquinona é uma molécula não proteica altamente lipossolúvel presente na MIM de inúmeros organismos, que atua como acceptor dos elétrons oriundos tanto do complexo I quanto do complexo II.

O complexo II (succinato desidrogenase) catalisa uma reação que faz parte do *ciclo de Krebs* e recebe elétrons oriundos da oxidação de succinato transportando-os através de moléculas de FADH₂ e centros ferro-enxofre, até a ubiquinona, reduzindo-a e formando ubiquinol. O complexo II constitui o segundo ponto de entrada de elétrons na CTE, mas, diferente dos outros complexos proteicos, não é capaz de transportar prótons para o espaço

intermembrana. Uma vez reduzido, o ubiquinol é re-oxidado no complexo III (ubiquinol-citocromo *c* oxido-redutase) transferindo seus dois elétrons para a molécula de citocromo *c*.

O transporte de elétrons no complexo III é bastante intrincado, pois envolve um conjunto de reações de oxi-redução, chamado de *ciclo Q*, onde os dois elétrons provenientes do ubiquinol percorrem caminhos distintos dentro deste complexo protéico. Isto ocorre porque a molécula de ubiquinol transfere dois elétrons para o complexo III, mas apenas um destes será transferido diretamente para o citocromo *c*, uma vez que esta proteína só é capaz de transportar um único elétron por vez. Assim, um dos elétrons do ubiquinol é transferido para centros ferro-enxofre, posteriormente para o citocromo *c1*, e deste para o citocromo *c*, enquanto o outro elétron segue para o grupamento heme *bL*, em seguida para o grupamento heme *bH* e por último para uma outra molécula de ubiquinona, formando uma espécie parcialmente reduzida chamada semiquinona (Q^{\bullet}). Numa segunda etapa, outra molécula de ubiquinol transfere seus dois elétrons para o complexo III, onde um dos elétrons será encaminhado para o citocromo *c* enquanto o outro será transferido para o grupamento heme *bL*, posteriormente para o grupamento heme *bH* até uma semiquinona, regenerando uma molécula de ubiquinol completando o transporte de elétrons até o citocromo *c* (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Vale ressaltar que no complexo III, assim como ocorre no complexo I, concomitante ao transporte de elétrons do ubiquinol até o citocromo *c*, ocorre o transporte de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas.

O elétron presente no citocromo *c* é transferido para o complexo IV ou citocromo *c* oxidase. Este complexo é composto por duas subunidades (I e II), sendo que a subunidade II possui o centro binuclear de cobre A e recebe os elétrons do citocromo *c*. Já a subunidade I possui dois grupamentos heme (heme *a* e heme *a3*) e outro centro de cobre B (CuB) e é nesta subunidade que ocorre a ligação de uma molécula de oxigênio e sua posterior redução a duas moléculas de H_2O . Neste processo, há a transferência de quatro elétrons para a molécula de

oxigênio, um do CuB, dois do heme *a*₃ e o outro de uma tirosina ligada à histidina do CuB. O heme *a* é o aceptor de elétrons do centro CuA oriundos do citocromo c e sua principal função é regenerar o heme *a*₃ hipervalente, o centro CuB oxidado e o radical tirosil formados após a redução do oxigênio. Por fim, vale ressaltar que o heme *a*₃ do complexo IV é o sítio de ligação não apenas do oxigênio mas de diversos inibidores da respiração mitocondrial como o cianeto (CN⁻), a azida (N₃⁻), o NO, o sulfeto de hidrogênio (H₂S) e o monóxido de carbono (CO) (CLEETER e cols., 1994; NICHOLLS & FERGUSON, 2002; BLACKSTONE e cols., 2005).

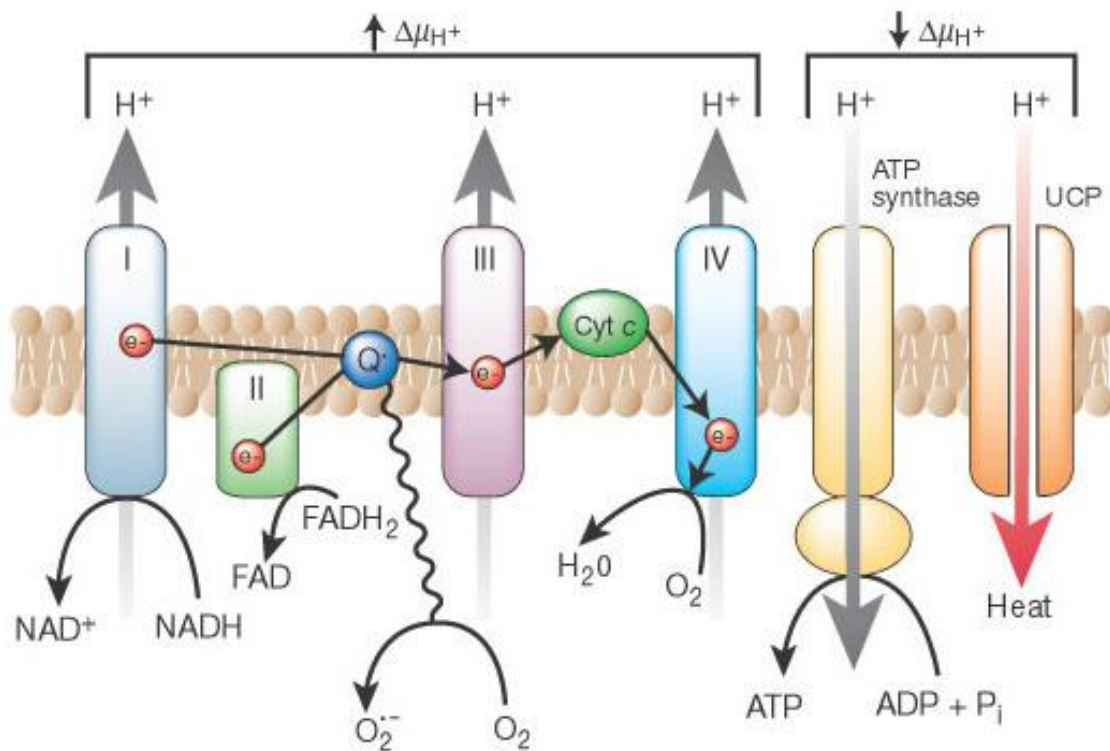


Figura 7: Representação esquemática do funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e da fosforilação oxidativa. O complexo I (NADH-ubiquinona óxido redutase) recebe dois elétrons do NADH e o complexo II (succinato desidrogenase) recebe elétrons do FADH₂; o complexo III (ubiquinol-citocromo c oxido-redutase) recebe elétrons semiquinona (Q[•]) e os transfere para o citocromo c (Cyt c). O complexo IV (citocromo c oxidase) recebe elétrons do Cyt c e os transfere para o oxigênio gerando água. A ATP sintase utiliza o potencial de membrana formado pelo gradiente de prótons para sintetizar ATP e as proteínas desacopladoras (UCP) dissipam o gradiente de prótons gerando calor. O transporte de elétrons está representado pelas setas pretas e o transporte de prótons (H⁺) está representado pelas setas cinza. O vazamento de elétrons da cadeia e formação de superóxido ocorre principalmente pela reação da Q[•] com o oxigênio molecular (Adaptado de BROWNLEE, 2001).

1.8.2. A formação do potencial de membrana mitocondrial e a síntese de ATP:

A transferência de elétrons ao longo da CTE segue uma ordem determinada pelo crescente valor de potencial de redução (E^0) do complexo I até o complexo IV e finalmente ao oxigênio, o aceptor final de elétrons. Por um mecanismo ainda muito pouco conhecido, concomitante ao transporte de elétrons na MIM, ocorre o transporte de prótons (H^+) da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana através dos complexos I, III e IV, contra um gradiente eletroquímico. O acúmulo de prótons no espaço intermembrana gera um gradiente eletroquímico, também chamado de *força próton-motriz*, que é utilizado pela F_1F_0 -ATP sintase para a produção de ATP (MITCHELL, 1980). Assim, a catálise de uma reação termodinamicamente desfavorável, a fosforilação do ADP, está acoplada a um processo termodinamicamente favorável, o retorno dos H^+ para a matriz mitocondrial realizado pela F_1F_0 -ATP sintase, que utiliza a energia acumulada da *força próton-motriz* para sintetizar ATP.

A energia livre disponibilizada durante o transporte de elétrons, oriundos das oxidações dos nutrientes até o oxigênio, é utilizada para transportar prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana contra o gradiente eletroquímico de prótons (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). Pelo fato da MIM ser bastante impermeável aos prótons, é estabelecido um gradiente eletroquímico (MITCHELL, 1980). Este gradiente possui dois componentes, sendo um químico e outro elétrico que juntos compõem a força próton-motriz. A energia livre deste gradiente é então aproveitada pelo complexo V (F_1F_0 -ATP sintase) para sintetizar ATP a partir de ADP e P_i (MITCHELL, 1980), acoplando assim o consumo de oxigênio à síntese de ATP. O retorno dos prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, que ocorre através da porção F_0 da F_1F_0 -ATP sintase, induz mudanças conformacionais nas subunidades beta da porção F_1 , promovendo a síntese de ATP (BOYER,

2002). Assim, em condições normais, diz-se que o consumo de oxigênio está acoplado à síntese de ATP na mitocôndria (SARASTE, 1999).

Apesar da baixa permeabilidade da MIM, existe um vazamento de prótons que resulta em consumo de oxigênio não associado a síntese de ATP, ou **desacoplamento** da fosforilação oxidativa, com dissipação de energia sob a forma de calor (BRAND, 1999). O vazamento de prótons passivo depende apenas na força próton-motriz e da natureza da MIM. Alternativamente os prótons podem retornar à matriz mitocondrial por vias que não passam pela F_1F_0 -ATP sintase, desacoplando a respiração mitocondrial da síntese de ATP. Este desacoplamento mitocondrial pode ocorrer fisiologicamente através da atividade de proteínas carreadoras de prótons localizadas na MIM que permitem a passagem de prótons do espaço intermembrana de volta para a matriz: são as chamadas proteínas desacopladoras ou UCP, do inglês *uncoupling proteins* (KRAUSS e cols., 2005). A dissipação do gradiente de prótons mediado por UCP (figura 7) parece regular diversas funções biológicas como a geração de calor, a morte celular, o controle da geração de espécies reativas de oxigênio e a neuroproteção (KRAUSS e cols., 2005; BRAND e cols., 2004; MATTIASSON e cols., 2003).

Em condições especiais como o acúmulo de cálcio na mitocôndria, acompanhado de estresse oxidativo e depleção de nucleotídeos adenínicos, abre-se um poro não específico na MIM conhecido como poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP). O mPTP é um canal de alta condutância que uma vez aberto leva ao aumento da permeabilidade da MIM a moléculas com massa molecular de até 1500Da, um fenômeno conhecido como “transição de permeabilidade mitocondrial” (ZORATTI & SZABO, 1995). As bases moleculares deste fenômeno ainda são controversas mas sua importância é crescente, como tem sido demonstrado em diferentes modelos *in vivo* de patologias, como por exemplo isquemia e reperfusão e doenças neurodegenerativas, onde a inibição do mPTP com ciclosporina tem

efeito protetor (OKONKWO & POVLISHOCK, 1999; FRIBERG & WIELOCH, 2002; KRISTAL e cols., 2004; SOANE e cols., 2007).

1.8.3. A geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio:

As mitocôndrias são importantes fontes de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular (CADENAS e DAVIES, 2000; BRAND e cols., 2004). Embora o H_2O_2 tenha sido a primeira espécie detectada em mitocôndrias isoladas, sabe-se hoje que a espécie primária gerada pela redução parcial do oxigênio é o ânion superóxido (BOVERIS e cols., 1972; BOVERIS & CHANCE, 1973). Uma vez que o oxigênio possui uma grande afinidade por elétrons, resultado do seu alto potencial de redução, uma pequena fração destas moléculas é parcialmente reduzida nas mitocôndrias gerando espécies dotadas de alta reatividade chamadas de *espécies reativas de oxigênio* (ROS).

As ROS compreendem moléculas que possuem átomos de oxigênio contendo pelo menos um elétron desemparelhado, por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH^\cdot), ou ainda moléculas que não possuem elétrons desemparelhados, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mas que ainda assim são capazes de reagir com metais de transição e gerar radicais livres altamente reativos. Pelo fato dos radicais livres possuírem elétrons desemparelhados, são dotados de alta reatividade, pois tendem a atingir a estabilidade doando ou removendo um elétron de biomoléculas adjacentes, como açúcares, lipídeos e proteínas, resultando na modificação destas moléculas (TURRENS, 2003).

A contribuição relativa de cada complexo da CTE para a produção de superóxido varia de órgão para órgão e depende do estado metabólico em que a mitocôndria se encontra. O trabalho pioneiro de Chance e Williams em 1955 definiu os cinco estados metabólicos mitocondriais sendo, o estado 3, definido pela respiração associada à síntese de ATP, e o

estado 4, definido pela respiração não associada à síntese de ATP, os mais importantes para o entendimento das disfunções mitocondriais na sepse. Assim, quando a mitocôndria encontra-se sintetizando ativamente ATP no estado 3, com altos níveis de substratos respiratórios e ADP, tanto o fluxo de elétrons pelos complexos da cadeia transportadora quanto o consumo de oxigênio são elevados e os complexos encontram-se mais oxidados. Nesta condição, o vazamento de elétrons pela cadeia transportadora e a geração de superóxido são mínimos. Por outro lado, quando a disponibilidade de ADP é limitada, o fluxo de elétrons pelos complexos da cadeia transportadora e o consumo de oxigênio são reduzidos e os complexos encontram-se mais reduzidos, caracterizando a respiração em estado 4. Nesta condição, o vazamento de elétrons pela cadeia transportadora e a geração de superóxido é máxima (BOVERIS & CHANCE, 1973).

Em condições fisiológicas, o aumento do potencial de membrana mitocondrial está diretamente relacionado à produção de superóxido uma vez que o desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons e da fosforilação oxidativa resulta numa drástica diminuição da geração de ROS (BOVERIS & CHANCE, 1973; KORSHUNOV e cols., 1997).

Os complexos I e III são os principais sítios de formação de superóxido por serem capazes de se auto-oxidar. O complexo I parece ser a principal fonte de superóxido no cérebro, especialmente em algumas situações patológicas como na doença de Parkinson, ou mesmo no envelhecimento normal (SCHAPIRA e cols., 1990; TURRENS, 2003). Em condições normais, a maior parte do superóxido é produzida como resultado da auto-oxidação da semiquinona, um intermediário semi-reduzido gerado no complexo III durante o *ciclo Q* (BOVERIS e cols., 1973). A transferência de elétrons dos complexos I e II para o complexo III ocorre em etapas, de forma que a ubiquinona é reduzida do lado interno da membrana interna mitocondrial formando o ubiquinol. Este migra para o outro lado da membrana interna mitocondrial e doa um elétron para o complexo III formando a semiquinona, um radical livre

que pode transferir elétrons diretamente para o oxigênio, formando superóxido (BOVERIS e cols., 1976; CADENAS e cols., 1977).

Devido à constante produção de ROS, as células necessitam de mecanismos de proteção, como enzimas antioxidantes e um sistema de reparo aos danos causados pelas ROS. Em condições normais, o superóxido produzido pela mitocôndria é rapidamente convertido a H_2O_2 pela isoforma mitocondrial da enzima superóxido dismutase (Mn-SOD), que alcança o citoplasma podendo participar de diversas reações de transdução de sinal (GRIENGLING e cols., 2000; KULISZ e cols., 2002; VEAL e cols., 2007). O aumento da geração de ROS ou a diminuição dos mecanismos antioxidantes pode gerar **estresse oxidativo**, processo pelo qual diversas biomoléculas são oxidadas, com modificação não apenas de sua estrutura, mas também de sua função, alterando assim atividades enzimáticas, a sinalização celular e estruturas celulares como membranas e DNA.

1.9. A Hipóxia Citopática e a Disfunção Mitocondrial na Sepses

A hipóxia tecidual é considerada uma das principais causas da supressão metabólica associada à sepsis. Durante a inflamação, mesmo na presença de níveis teciduais adequados de oxigênio nas proximidades das mitocôndrias, a utilização do oxigênio é ineficiente, caracterizando um fenômeno conhecido como **hipóxia citopática** (FINK, 2001). Diversos mecanismos foram propostos para explicar este fenômeno, incluindo a diminuição da disponibilidade de substratos para o ciclo de Krebs (como o piruvato), o aumento da atividade da enzima nuclear poli ADP-ribose polimerase (PARP), que utiliza NAD^+ em sua reação enzimática gerando um desbalanço energético intracelular, a inibição de enzimas tanto do ciclo de Krebs quanto dos complexos da CTE e o colapso do gradiente de prótons resultado do desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial (CROUSER, 2004).

As primeiras associações estabelecidas entre a má distribuição de oxigênio tecidual e a mortalidade de pacientes com sinais clínicos de falência circulatória, incluindo doentes com falência cardíaca, sepse e hipovolemia, foram feitas há mais de 40 anos (BRODER & WEIL, 1964). Este estudo correlacionou os altos níveis de lactato sanguíneo com a mortalidade dos pacientes, e concluiu que a falta de oxigênio seria a causa primária da lesão tecidual e da disfunção orgânica presentes no choque séptico. Estudos mais recentes sustentam a idéia de que a hipóxia tecidual desempenha um papel importante na patogênese da falência orgânica associada à sepse (SIELENKAMPER e cols., 2000). Entretanto, o aumento da oxigenação tecidual na tentativa de evitar o dano isquêmico, se mostrou ineficaz podendo até mesmo ser prejudicial ao paciente com sepse (HAYES e cols., 1994).

Os estudos realizados com modelos animais contribuíram significativamente para o entendimento da disfunção mitocondrial na fisiopatologia da sepse. Os primeiros estudos realizados utilizaram o modelo de endotoxemia em ratos. Os ratos injetados com LPS apresentavam uma diminuição de 40-50% no consumo de oxigênio hepático, indicando um efeito do LPS no fluxo de elétrons da cadeia transportadora ou ainda sobre o metabolismo de ADP, seja na ATP sintase ou no transportador de nucleotídeos de adenina (SCHUMER e cols., 1970b). Os autores demonstraram ainda que tanto em modelos animais quanto em biópsias de fígado humano incubadas com LPS, havia uma significativa inibição da respiração em estado 3, associada à síntese de ATP após a endotoxemia (SCHUMER e cols. 1970 a e b). Ainda neste estudo, observou-se que as mitocôndrias apresentavam uma drástica alteração ultra-estrutural com um inchamento incomum, além de exibirem uma perda da densidade da matriz mitocondrial.

Na mesma época Mela e colaboradores observaram inchamento e desacoplamento mitocondrial em resposta ao LPS. Seus estudos avaliaram a capacidade respiratória de mitocôndrias de fígado de rato no contexto do choque induzido tanto pela endotoxina de

Escherichia coli quanto pela hemorragia (MELA e cols., 1971). Uma dose letal de endotoxina foi capaz de promover alterações ultra-estruturais em poucas horas no mesmo momento em que a respiração mitocondrial associada à síntese de ATP era inibida em 30–50%. Além disso, a respiração mitocondrial encontrava-se parcialmente desacoplada da síntese de ATP, observado pelo aumento da respiração em estado 4 (MELA e cols., 1971). Boczkowski e colaboradores demonstraram que a respiração em estado 4 em mitocôndrias isoladas de diafragma de ratos expostos a LPS era significativamente maior do que em animais controle, indicando um desacoplamento da respiração mitocondrial mediado por peroxinitrito (BOCZKOWSKI e cols., 1999).

As espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio são amplamente produzidas durante a sepse e atuam tanto como substâncias vasoativas, responsáveis pela hiporeatividade vascular, quanto como inibidores da atividade mitocondrial (PODEROSO e cols., 1996; CASSINA e cols., 1996). Os complexos da CTE mitocondriais podem ser inibidos tanto pelo NO quanto pelas suas espécies correlatas como o peroxinitrito (CASSINA & RADI, 1996). Uma série de estudos mostra que o uso de antioxidantes é benéfico na sepse (BAYIR & KAGAN, 2008; ESCAMES e cols., 2003; NIN e cols., 2004; ZAPELINI e cols., 2008).

Este conjunto de evidências sugere que as disfunções orgânicas associadas à sepse se devem à falência bioenergética, com depleção dos níveis de ATP, induzida pelos efeitos do NO sobre a CTE. Sem dúvida, os níveis de NO estão aumentados durante a sepse, o que contribui para a nitração de inúmeras proteínas, inclusive dos complexos da CTE, comprometendo a produção de ATP em diversos órgãos.

Dentre os mecanismos responsáveis pela progressão da fase aguda relacionada à disfunção mitocondrial, o quadro de hiperglicemia associado à sepse parece ter um papel importante (VANHOREBEEK e cols., 2005). Van Den Berghe e colaboradores (2001) mostraram que um controle estrito da glicemia através da administração de insulina aos

pacientes sépticos trouxe grandes benefícios clínicos, acompanhados de uma recuperação da ultraestrutura das mitocôndrias dos músculos destes pacientes (VAN DEN BERGHE e cols. 2001).

Diversos estudos identificaram alterações na expressão de subunidades dos complexos da CTE mitocondrial, em diferentes tecidos durante a sepse. Estes estudos mostram diminuição nos níveis de RNA mensageiro e/ou proteína dos complexos da CTE sugerindo que uma inibição da síntese, aumento da instabilidade ou da degradação destas proteínas em diferentes modelos de sepse (CALLAHAN & SUPINSKI, 2005; CHEN e cols., 2003; LEVY e cols., 2004; WEI e cols., 2002). Independente da etiologia, o conteúdo reduzido de enzimas mitocondriais certamente representa algum tipo de impacto na capacidade bioenergética celular.

Os complexos da CTE mitocondrial podem estar afetados individualmente ou em conjunto na sepse, dependendo da espécie animal, tempo de doença e órgão estudados. A atividade do complexo I está significativamente diminuída na sepse, tanto em modelos animais (CHEN e cols., 2003; BREALEY e cols., 2004) quanto em músculo esquelético de pacientes sépticos (BREALEY e cols., 2002). Curiosamente, um estudo realizado com o modelo de CLP em ratos observou uma diminuição da atividade do complexo I em diversas regiões do cérebro, que era mais precoce no cerebelo (12h) surgindo no córtex, hipocampo e *striatum* apenas a partir de 24h após o início da sepse (COMIM e cols., 2008). A disfunção do complexo I também foi demonstrada em um modelo animal de endotoxemia no bulbo ventrolateral rostral, uma região do sistema nervoso central importante para o controle da pressão arterial (CHUANG e cols., 2002).

A diminuição da atividade dos complexos I e III já foi observada em outros tecidos como miocárdio de coelhos em um modelo de endotoxemia e coração de babuínos sépticos (TRUMBECKAITE e cols., 2001; GELLERICH e cols., 1999). A redução da atividade da

citocromo c oxidase já foi descrita em uma série de modelos de sepse (LEVY & DEUTSCHMAN, 2007). Além disso, a redução do consumo de oxigênio no estado 3 já foi demonstrada em diversos modelos de sepse, desde coração de ratos neonatos, fígado de felinos e diafragma de ratos com endotoxemia (FUKUMOTO e cols., 2002; CROUSER e cols., 2002; CALLAHAN & SUPINSKI, 2005). Os trabalhos do grupo de Poderoso e Boveris, identificaram uma marcante queda na respiração em estado 3 em músculo esquelético e fígado em diversos modelos de sepse (BOVERIS e cols., 2002). Claramente, todos estes estudos indicam que múltiplos defeitos na CTE mitocondrial podem levar a diminuição da capacidade bioenergética celular. O que ainda não está claro é que tipo de impacto estes defeitos podem causar à função orgânica.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese foi investigar a utilização de oxigênio e as alterações da função mitocondrial decorrentes da sepse.

Para isto, foram utilizados três diferentes modelos experimentais.

Objetivos específicos:

- Avaliar a função mitocondrial de macrófagos estimulados com LPS *in vitro* através do consumo de oxigênio e medidas de potencial de membrana mitocondrial.
- Avaliar a função mitocondrial de células mononucleares periféricas (PBMC) de pacientes sépticos *ex vivo* através do consumo de oxigênio em diferentes estados metabólicos.
- Estudar o papel da inflamação sistêmica na função mitocondrial do sistema nervoso central utilizando um modelo de sepse experimental clinicamente relevante.

3. METODOLOGIA

Cultura de Células:

O estudo das alterações da função mitocondrial de macrófagos em resposta ao LPS foi realizado *in vitro* utilizando-se a linhagem celular transformada de macrófagos de camundongo RAW 264.7. As células foram cultivadas em placas de Petri descartáveis de 100 mm em meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino, suplementado com antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), e mantidas em estufa umedecida contendo 5% de CO₂ e temperatura controlada a 37°C. As passagens eram feitas com um rodo de borracha utilizado para raspar a monocamada da placa de Petri. Uma alíquota da suspensão celular era diluída e homogeneizada em novo meio de cultura e as células eram plaqueadas.

Viabilidade Celular:

A viabilidade celular foi avaliada incubando-se uma alíquota de 20µl da suspensão celular com igual volume do corante Azul de Trypan 0,4% em salina. As células mortas apresentam a permeabilidade da membrana plasmática aumentada, tornando-se azuis imediatamente após a incubação com o corante. A observação e a contagem destas células em câmara de Neubauer ao microscópio não revelou aumento do número de células mortas após a incubação com LPS. A contagem de células viáveis era feita após as incubações com LPS e antes de cada experimento no oxígrafo. Os experimentos eram feitos idealmente com 5×10^6 células vivas por medida.

Consumo de Oxigênio:

O estudo da função mitocondrial dos macrófagos foi realizado através de medidas do consumo de oxigênio das células com eletrodo de Clark com temperatura controlada a 36°C. Células RAW 264.7 foram incubadas com LPS 1µg/ml em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino por diferentes tempos em cultura. Ao final de cada incubação as células eram gentilmente raspadas da placa no próprio meio de incubação, centrifugadas a 400g por 5 minutos e ressuspensas em Tampão de Respiração (Tris 10 mM, KH₂PO₄ 8mM, EGTA-K⁺ 1 mM, KCl 50 mM, Manitol 0,32 M pH 7,4). As medidas de consumo de oxigênio foram realizadas a 36°C com 5 x 10⁶ células vivas por cubeta em Tampão de Respiração. Ao início de cada experimento digitonina 0.005% e o inibidor do complexo I mitocondrial rotenona 2 µM eram adicionados à cubeta. A digitonina permeabiliza a membrana plasmática e nesta concentração não afeta a permeabilidade das membranas mitocondriais. A adição de rotenona teve o objetivo de evitar o fluxo reverso de elétrons para o complexo I após a adição de succinato, permitindo o fluxo de elétrons direto do complexo II para o complexo IV até o oxigênio, o aceptor final de elétrons. O consumo de oxigênio no estado 3 era estimulado com a adição de succinato 20 mM e ADP 200 µM às células permeabilizadas até aproximadamente 50% do oxigênio presente na cubeta ser consumido. Neste momento era adicionada à cubeta oligomicina 1 µg/ml induzindo um estado semelhante ao estado 4. Posteriormente o agente desacoplador FCCP 5µM era adicionado à cubeta para a indução máxima do consumo de oxigênio. Os estudos da respiração de PBMC isolados de pacientes foram realizados utilizando o mesmo protocolo acima (detalhes sobre o isolamento de PBMC no manuscrito anexado ao resultados Parte II).

O estudo da função mitocondrial do cérebro de camundongos foi realizado utilizando-se diferentes técnicas. O consumo de oxigênio e a atividade do complexo IV da CTE mitocondrial foram medidos no oxígrafo. A atividade dos outros complexos da CTE mitocondrial e o conteúdo de citocromos no tecido cerebral foram medidos por espectrofotometria. As medidas de potencial de membrana mitocondrial e a produção de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos foram realizadas por fluorimetria. Maiores detalhes encontram-se descritos no artigo anexado aos resultados Parte III.

Medidas de Potencial de Membrana Mitocondrial:

O potencial de membrana dos macrófagos foi estimado avaliando-se a fluorescência do JC1 (Molecular Probes, USA). Esta sonda altera sua emissão de fluorescência dependendo da concentração de prótons. No meio intracelular o JC1 pode existir tanto na forma monomérica quanto agregada, emitindo fluorescência verde ou vermelha, respectivamente. Durante a hiperpolarização do potencial de membrana o JC1 se encontra agregado e emite fluorescência na região do vermelho; com a despolarização do potencial de membrana o JC1 encontra-se na forma de monômero emitindo fluorescência verde (REERS e cols., 1991). Assim, a razão entre a fluorescência vermelha e verde representa um índice do potencial de membrana mitocondrial. As células RAW 264.7 foram incubadas com JC1 por 30 minutos e posteriormente com 0,25 µg/ml LPS por 1h ou 5 µM FCCP para o controle positivo de despolarização do potencial de membrana. A fluorescência foi registrada por microscopia de epifluorescência nos canais verde e vermelho para cada campo. A intensidade de fluorescência de cada campo foi quantificada através do programa Adobe Photoshop.

Avaliação da Atividade Inflamatória – ELISA TNF- α

O nível de ativação dos macrófagos incubados com LPS foi medido pela produção de TNF- α secretado para o meio de cultura. Os macrófagos foram estimulados com LPS na presença de diversos inibidores nas seguintes concentrações: rotenona 2 μ M, difeniliodonio 10 μ M e antimicina A 1 μ g/mL. Alíquotas de meio de cultura condicionado foram analisadas utilizando-se um Kit LISA anti-*mouse* TNF- α de acordo com o procedimento indicado pelo fabricante (R&D Systems)

Aprovação dos Estudos com Cobaias e Material Humano:

Todos os protocolos realizados nesta tese obtiveram aprovação pelos comitês de ética responsáveis. Os procedimentos realizados com camundongos suíços para os estudos de sepsis experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética da Fiocruz. A obtenção de amostras de sangue de pacientes foi realizada com o consentimento familiar e aprovação pelos comitês de ética dos hospitais Quinta D'Or e Clementino Fraga Filho.

4. RESULTADOS

Os resultados desta tese estão divididos em três partes:

Parte I. Estudos sobre o efeito do LPS na função mitocondrial de macrófagos RAW

264.7 (dados não publicados)

Parte II. Estudos sobre a função mitocondrial de monócitos isolados de pacientes sépticos

(manuscrito em preparação)

Parte III. A sepse experimental induz alterações da função mitocondrial no sistema

nervoso central de camundongos (Artigo publicado na revista *Critical Care Medicine*,

D'AVILA e cols., 2008).

Parte I. Estudos sobre o efeito do LPS na função mitocondrial de macrófagos RAW 264.7

a) A estimulação com LPS resulta em alterações precoces na função mitocondrial de macrófagos:

Iniciamos os estudos dos efeitos de estímulos inflamatórios sobre a função mitocondrial de macrófagos utilizando células RAW264.7 estimuladas com LPS *in vitro*. A Figura 8 mostra curvas de consumo de oxigênio representativas de macrófagos controles na ausência de LPS (A) e na presença de LPS por 1h (B). Os experimentos foram realizados na presença de rotenona, um inibidor do complexo I da CTE e subsequentes adições de succinato + ADP, oligomicina e FCCP. O succinato é um doador de elétrons para o complexo II da CTE. A adição de succinato + ADP induziu o consumo de oxigênio associado à síntese de ATP (estado 3) de forma semelhante nos macrófagos controle (Figura 8 A) e ativados (Figura 8 B). Com a adição do inibidor da F_1F_0 ATP sintase, oligomicina, os macrófagos reduziram o consumo de oxigênio em um estado equivalente ao estado 4, onde o consumo de oxigênio é mínimo devido ao efeito repressor da força próton-motriz sobre o fluxo de elétrons na CTE resultante da inibição na síntese de ATP. Com a adição do agente desacoplador FCCP observamos o consumo máximo de oxigênio devido à despolarização do potencial de membrana mitocondrial que foi semelhante entre os grupos.

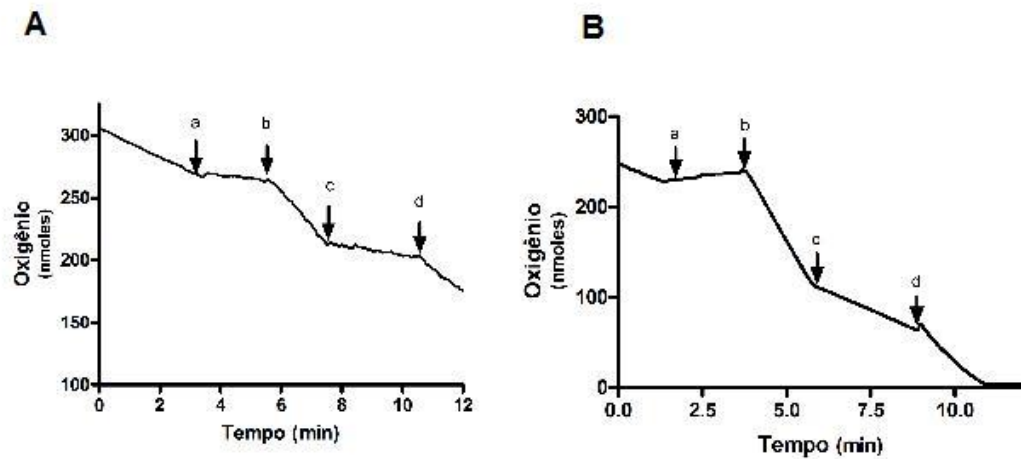


Figura 8: Os LPS induz alterações precoces da função mitocondrial de macrófagos in vitro. O consumo de oxigênio das células permeabilizadas foi medido com um eletrodo de Clark a 36°C. A figura mostra traçados representativos do consumo de oxigênio de macrófagos controle (A) e estimulados com LPS (1 µg/ml) por 1h (B). As setas indicam as adições de **a**-rotenona, **b**-succinato (20 mM) + ADP (0,1 mM), **c**-oligomicina (1 µg/ml) e **d**-FCCP (5 µM).

O aumento do consumo de oxigênio observado na presença de LPS não foi devido ao *burst* oxidativo característico de macrófagos ativados (SBARRA & KARNOVSKY, 1959), pois a adição de rotenona inibiu em cerca de 100% a respiração basal dos macrófagos estimulados com LPS (Figura 8).

Na Figura 9 observamos a quantificação dos estados metabólicos 3 (Figura 9A) e 4 (Figura 9B) e da razão do controle respiratório (RCR) (Figura 9C) nas células tratadas com LPS por diferentes tempos. Observamos que os macrófagos incubados com LPS apresentam um rápido aumento da respiração no estado 4 (figura 9B) e cerca de 75% de inibição da respiração no estado 3 após 7h de incubação com LPS. A exposição ao LPS induz um progressivo aumento da respiração no estado 4 (Figura 9 B) indicando um aumento do vazamento de prótons pela membrana interna mitocondrial, estabelecendo o quadro de desacoplamento da fosforilação oxidativa.

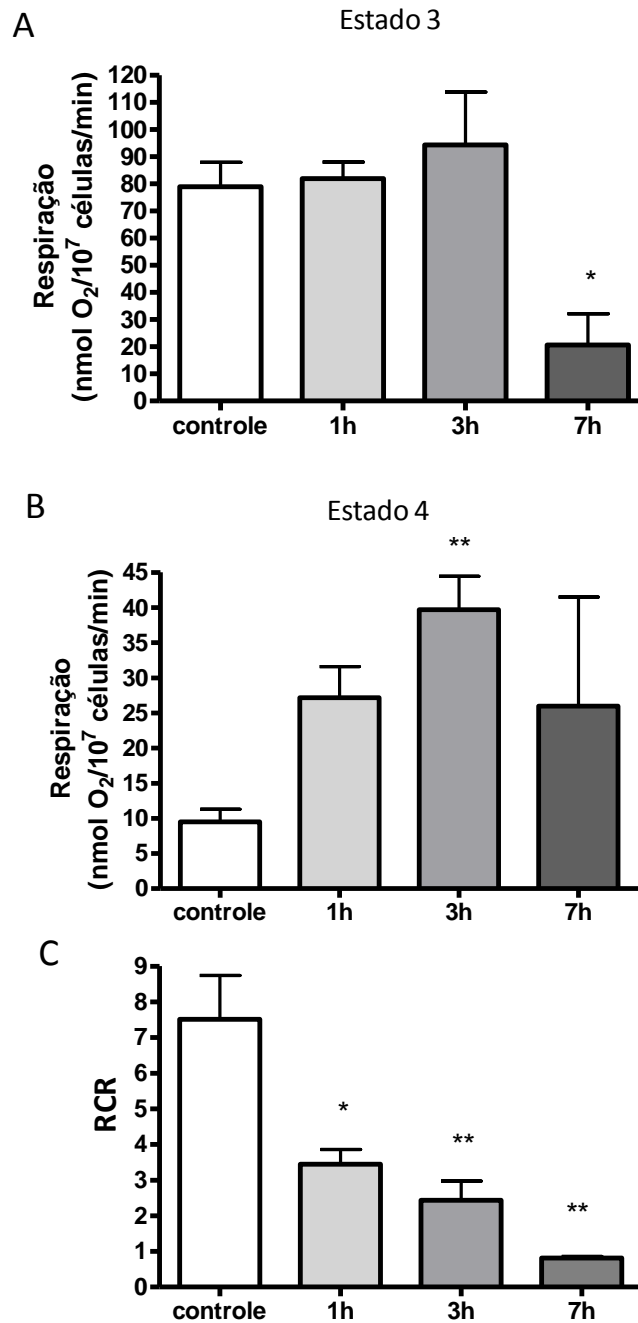


Figura 9: Os macrófagos estimulados com LPS *in vitro* apresentam uma progressiva diminuição da razão do controle respiratório. Células RAW foram incubadas com ou sem LPS (1 μ g/ml) por diferentes tempos. O consumo de oxigênio no estado 3 (A) foi estimulado com succinato (20mM) + ADP (200 μ M) e o estado 4 (B) foi induzido com a adição de oligomicina (1 μ g/ml). O controle respiratório (C) foi calculado através da razão entre o consumo de oxigênio no estado 3 pelo estado 4 (estado 3 / estado 4). LPS (n=5), LPS 1h (n=3), LPS 3h (n=3) e LPS 7h (n=3). ANOVA e Teste Tukey *a posteriori*. * P<0,05 **P<0,01 em relação ao controle.

Estas alterações se refletem em uma diminuição significativa ($P < 0,05$) da RCR dos macrófagos que acontece rapidamente, já na primeira hora de incubação (Figura 9 C). A razão do controle respiratório reflete indiretamente o grau de integridade da membrana interna mitocondrial. A diminuição da RCR pode ser explicada por um aumento da respiração no estado 4 induzido pelo LPS, caracterizando um desacoplamento da fosforilação oxidativa (Figura 9 B). Não houve diferença significativa na respiração em estado 3 até aproximadamente 7h de incubação com LPS, quando uma drástica queda do consumo de oxigênio no estado 3 foi observada (Figura 9 A).

Utilizamos um método alternativo para estimar o efeito do LPS sobre o potencial de membrana mitocondrial. A sonda fluorescente JC-1 que se acumula na mitocôndria sob a forma de agregados que emitem fluorescência vermelha. Uma vez que a mitocôndria despolariza e há diminuição do potencial de membrana mitocondrial o JC-1 alcança o citoplasma e ganha a forma monomérica, que emite fluorescência verde. A distribuição dos sinais de fluorescência vermelha e verde nas células em cultura pode ser facilmente observado por microscopia. dos macrófagos. Observamos que a incubação com LPS por apenas 1 hora resultou numa diminuição significativa ($P < 0,05$) do potencial de membrana mitocondrial (figura 10), atingindo níveis comparáveis aqueles exibidos pela incubação com o ionóforo de prótons FCCP.

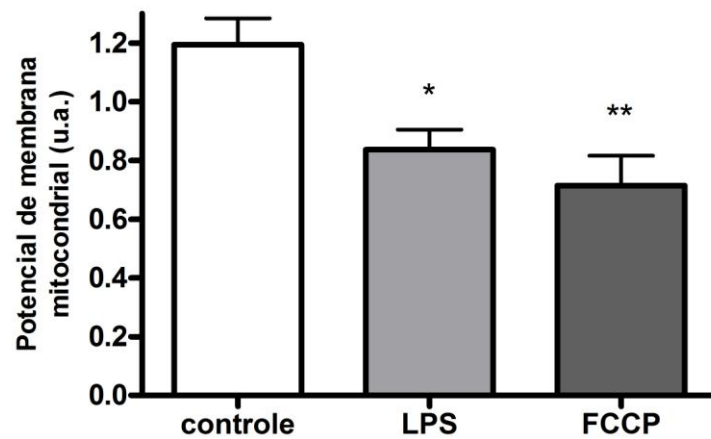


Figura 10: A ativação com LPS diminui o potencial de membrana mitocondrial dos macrófagos. Os macrófagos em cultura foram incubados com LPS (0,25 $\mu\text{g/ml}$) por 1h. Após a incubação com LPS as células foram lavadas 3x com PBS e incubadas com JC1 (5 $\mu\text{g/ml}$) por 30 min. A fluorescência do JC1 nos canais verde e vermelho foi medida em microscópio de fluorescência e convertida em intensidade de fluorescência com o programa Adobe Photoshop. O potencial de membrana foi estimado pela da razão entre as intensidades de fluorescência por campo nos canais vermelho e verde (vermelho / verde) u.a. (unidades arbitrárias). Teste T (* $P=0.04$ em relação ao controle).

b) A secreção de TNF- α depende da atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial:

No intuito de verificar a dependência da função mitocondrial na função celular, avaliamos a secreção de TNF- α em células incubadas na presença de inibidores de flavoenzimas, além de outros inibidores da CTE em concentrações sabidamente não-letais. Observamos na figura 11 que 1h de incubação com LPS foi suficiente para aumentar em cerca de 10 vezes a secreção de TNF- α pelos macrófagos em cultura e que a função mitocondrial é essencial para a atividade inflamatória dos macrófagos, pois a secreção de TNF- α foi completamente inibida na presença não apenas de um inibidor de flavoenzimas (DPI), mas também dos inibidores da CTE mitocondrial, rotenona e antimicina A (Figura 11).

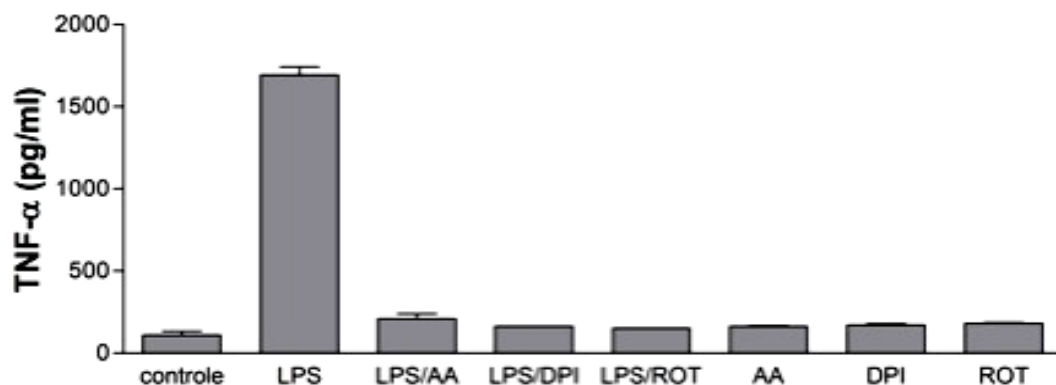


Figura 11: A secreção de TNF- α pelos macrófagos estimulados com LPS depende da atividade da CTE mitocondrial. Células foram incubadas em meio RPMI com 10% de soro (controle) ou meio adicionado de LPS (1 μ g/ml) durante 1h na presença de concentrações não letais de antimicina A 1 μ g/ml (AA), difeniliodônio 10 μ M (DPI) e rotenona 2 μ M (ROT). Após o tempo de incubação alíquotas do meio de cultura foram coletadas e a concentração de TNF- α foi medida por ELISA. Os valores utilizados neste gráfico são a média de três alíquotas de cada poço de dois experimentos independentes (n=4 por grupo, 2 poços por experimento). Teste T * P < 0.05.

Parte II. Estudos sobre a função mitocondrial de monócitos isolados de pacientes sépticos:

Em paralelo ao estudo *in vitro* com a linhagem celular de macrófagos nós também avaliamos a função mitocondrial de células mononucleares periféricas (PBMC) isoladas de pacientes sépticos. Os resultados deste estudo estão descritos em um manuscrito que se encontra em fase final de preparação e será submetido em breve para publicação.

Resumidamente, este estudo mostrou que PBMC isolados de pacientes sépticos apresentam uma diminuição do consumo de oxigênio associado à síntese de ATP (respiração no estado 3).

Authors: André M. Japiassú*; Joana da Costa P. d'Avila*, Ana Paula S. A. Santiago, Antonio Galina, Hugo C. Castro Faria-Neto, Fernando A. Bozza*, Marcus F. Oliveira*

Title: Sepsis affect mitochondrial oxygen consumption associated to ATP synthesis in human peripheral blood monocytes by modifying mitochondrial ADP phosphorylation

From the Laboratório de Bioquímica Redox, Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia (JCPDA, APSAS, MFO), Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial, Programa de Biofísica e Bioquímica Celular (AG), Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Laboratório de Imunofarmacologia (AMJ, HCCFN), Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (FAB), Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Addresses: Marcus F. Oliveira, PhD, Laboratório de Bioquímica Redox, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil. Phone: (+55-21) 25626755, Fax: (+55-21) 22708647, E-mail: maroli@bioqmed.ufrj.br or to Fernando A. Bozza, PhD, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21040-900, Phone: (+55-21) 3865-9620; Fax: (+55-21) 2290-4532, E-mail: bozza.fernando.bozza@gmail.com.

* - These authors have equally contributed to this work.

Abstract:

Objective: Sepsis-induced organ dysfunction is triggered at the subcellular level by mitochondrial and energy metabolism dysfunction. Here, we investigated mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from septic shock (SS) patients. Design: Prospective clinical and laboratory study. Setting: Three intensive care units at tertiary hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Patients: Fifteen SS patients were included in the first 48 hours after sepsis diagnosis. Interventions: None. Measurements: Rates of mitochondrial oxygen consumption in PBMC were determined in different metabolic states in control and SS groups. Results: PBMC from SS patients exhibited a reduction in oxygen consumption associated to ATP synthesis compared to the control group. However, mitochondrial respiration during inhibition of F₁F₀ ATP synthase or uncoupling of oxidative phosphorylation were identical in both groups. Conclusion: Mitochondrial dysfunction is present in immune cells from SS patients and is a result of changes in mitochondrial ADP phosphorylation.

Keywords: immune system, electron transport chain, monocytes, inflammation, energy metabolism.

Introduction:

Recent evidence has indicated the association between changes in mitochondrial function and the pathogenesis of sepsis-associated multiple organ dysfunction syndrome (MODS) [1-8]. However, controversy exists regarding the mechanism of mitochondrial dysfunction. A reduction of electrons flow through mitochondrial electron transport chain (ETC) complexes, resulting on impairment of oxygen consumption is sometimes detected [1,4]. Additionally, uncoupling of oxidative phosphorylation, due to activation of uncoupling proteins or the opening of the permeability transition pore, may also take place [7]. Few studies have investigated the mitochondrial function in human sepsis [5,6]. Thus, the present work was designed to investigate the potential mechanisms of mitochondrial dysfunction in PBMC from septic shock (SS) patients.

Patients and methods:

Control and septic shock (SS) patients

The Institutional Review Board (IRB) of participating institutions approved the study protocol. All patients, or their legal surrogates, gave written informed consent before any study-related procedures. SS patients from three medical-surgical intensive care units of tertiary hospitals were included in the first 48 hours after sepsis diagnosis. We excluded patients who were pregnant or aged less than 18 years old. SS was defined by the presence of two or more diagnostic criteria for SIRS [9], proven or suspected infection, new dysfunction of at least one organ, hypotension despite adequate fluid resuscitation (40 mL/kg of crystalloids and/or 20 mL/kg of colloids, in 2 hours), and requiring vasopressor support consisting of at least 0.1 µg/kg/min of norepinephrine. Simplified Acute Physiologic Score (SAPS) II was calculated with data from the first 24 hours after inclusion in the study and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) was analyzed every 48 hours in the first week. SS patients were treated based on established guidelines [10], and included aggressive fluid resuscitation, broad-spectrum antibiotic therapy within the first 24 hours, and at least one dose of hydrocortisone. The outcomes analyzed were 28th day and ICU survival. Control group consisted of critically-ill patients (n=13) without sepsis or any type of shock.

Cells

Twenty milliliters of citrated arterial blood from SS patients, in the first 48 hours of sepsis, or controls were diluted in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) pH 7.4 to a final volume of 40 mL. Diluted blood (20 mL) was kept at room temperature for 30 minutes and then applied onto the top of 10 mL of a Ficoll-Hypaque 100% solution. Mononuclear cells (PBMC) were isolated as previously described [11]. Contamination with other cell types was assessed by

flow cytometry and revealed that neutrophils and granulocytes accounted for only 2.5 % of PBMC fraction (data not shown). Evaluation of mitochondrial function was carried out immediately after the PBMC isolation.

Oxygen consumption measurements

Mitochondrial respiration in PBMC was assessed polarographically, by using an oximeter fitted with a water-jacketed Clark-type electrode (Yellow Springs Instrument, Model 5300, USA) or in a high resolution oxygraph (Oroboros Inc, Austria), in a 1.1 mL or 2.0 mL reaction vessels, respectively, as previously described [7]. Further details were given in supplementary data.

Statistical analyses

Clinical numerical variables were expressed as mean \pm SD and oxygen consumption were expressed as box plots with median, 25-75 percentiles and maximum/minimum values for each condition. Comparisons were done by the nonpaired Student's t test or one-way ANOVA analysis of variance and a posteriori Tukey's test for pair-wise comparisons. Differences of $p < 0.05$ were considered to be significant. Student's t test, ANOVA and Tukey's test were performed by GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA).

Results:

We studied 13 control individuals and 13 SS patients, whose characteristics are presented in Table 1. Control and SS patients had similar age and different severity of illness on ICU admission. SS patients had a high level of organ dysfunction, with a mean SOFA score of 9.3 ± 3.31 points on the first day of inclusion. All patients had shock and required the use of mechanical ventilation, and almost half (46%) needed renal supportive therapy during treatment.

Figures 1A and 1B show that PBMC from SS patients exhibited strong reduction in the oxygen consumption associated to ATP synthesis (“state 3 respiration”), induced by succinate and ADP (control = 9.87 vs. SS = 3.91 nmols O₂/min/10⁷ cells, $p < 0.01$) compared to control. Oligomycin-induced inhibition of F₁F₀ ATP synthase during “state 3 respiration” reduced the mitochondrial oxygen consumption in both control and SS groups to undistinguishable levels (control = 1.80 vs. SS = 1.57 nmols O₂/min/10⁷ cells), suggesting similar proton permeability at inner mitochondrial membrane among groups (Figures 1A and 1B). To understand the nature of state 3 inhibition in cells from SS patients, we measured the maximum rates of oxygen consumption after complete dissipation of proton gradient, by using the protonophore FCCP. Figures 1A and 1B show that FCCP stimulated oxygen consumption upon oligomycin-induced “state 4-like” respiration in a similar fashion in both groups (control = 6.10 vs. SS = 4.59 nmols O₂/min/10⁷ cells, non significant). The respiratory control ratio (RCR), an index that indirectly reflects the “integrity” of mitochondria, was significantly reduced in the SS group (control = 7.86 vs. SS = 2.72, $p = 0.01$) (Figure 1C).

Discussion:

Sepsis is associated with changes in cell metabolism and evidence points to the critical role of mitochondria in these events [1-8]. Derangements in energy homeostasis and mitochondrial function appears to be linked to either impairment of electrons flow through the ETC complexes [12], or increased proton leak, which may lead to the uncoupling of oxidative phosphorylation [1-8]. These changes can affect mitochondrial oxygen consumption, resulting in a bioenergetic failure frequently seen in sepsis. Here, we demonstrate that a reduction in oxygen consumption associated with ATP synthesis occurs early in PBMC from SS patients (Figures 1A and 1B) and is associated to changes in mitochondrial ADP phosphorylation, which ultimately compromise the respiratory control ratio (Figure 1C). The set of data presented here indicates that, in immune cells from SS patients, the compromise of mitochondrial function does not involve reduced electron flow through the ETC complexes nor succinate transport mediated by the dicarboxylate carrier across inner mitochondrial membrane (Figure 2). This is supported by the similar increase of uncoupled mitochondrial respiration induced by FCCP among groups, which were not distinct to state 3 respiration rates (Figures 1B). Rather, inhibition of state 3 respiration observed in SS patients results from an interference of mitochondrial ADP phosphorylation, involving any component responsible for ATP synthesis, such as the adenine nucleotide translocator (ANT), the F1Fo ATP synthase, as well as the phosphate carrier. Previous evidence have pointed out reduced expression of genes involved in oxidative phosphorylation during sepsis, such as the F1Fo ATP synthase [2,13]. Additionally, some of these components can be inhibited by oxidative stress conditions [14]. The present work is the first demonstration of functional changes in mitochondrial ADP phosphorylation apparatus in immune cells from septic patients.

Noteworthy, the integrity of inner mitochondrial membrane was preserved as shown by prompt reduction in oxygen consumption after inhibition of F1Fo ATP synthase by

oligomycin in both groups, indicating low proton leak. The recent publication of Belikova and colleagues demonstrated inhibition of mitochondrial respiration associated to ATP synthesis and uncoupling of oxidative phosphorylation in PBMC from septic patients [5]. Our data agrees with Belikova's work specifically over the reduced state 3 respiration (Figures 1A and 1B), but not on the increased proton leak. Conceivably, experimental differences explain discrepancies regarding the proton permeability observed in these studies since: 1) in the present work, mitochondrial function was assessed directly from cells of SS patients; 2) the previous data [5] were based on cells from healthy donors kept with plasma of septic patients. Loss of mitochondrial membrane potential was also previously shown in late sepsis, which correlated with appearance of apoptosis markers [11]. Finally, it worths mention that changes in oxygen consumption observed here are very early and extrapolation of their effects on disease progression is unwarranted.

We conclude that inhibition of oxygen consumption associated to ATP synthesis in immune cells from SS patients is related to a deficiency in mitochondrial ADP phosphorylation, which contribute to metabolic and functional changes in immune cells during sepsis.

Acknowledgements:

The study was supported by grants from PAPES IV/FIOCRUZ, FUJB and FAPERJ. MFO, HCCFN and AG are research scholars from CNPq. MFO and FAB are fellows of FAPERJ Jovens Cientistas do Nosso Estado. We also thanks to Dr. Adriana Broxado (Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro) for the kind assistance on flow cytometry analysis.

References:

1. Crouser ED (2004) Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion* 4:729-741.
2. Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Mandich DV, Green-Church KB (2006) A proteomic analysis of liver mitochondria during acute endotoxemia. *Intensive Care Med* 32:1252-1262.
3. Bernard N, Matecki S, Py G, Lopez S, Mercier J, Capdevila X (2003) Effects of prolonged mechanical ventilation on respiratory muscle ultrastructure and mitochondrial respiration in rabbits. *Intensive Care Med* 29:111-118.
4. Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, Pfeiffer DR (2002) Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit Care Med* 30: 276-284.
5. Belikova I, Lukaszewicz AC, Faivre V, Damoiseil C, Singer M, Payen D (2007) Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis. *Crit Care Med* 35: 2702-2708.
6. Singer M (2007) Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med* 35: S441-448.
7. d'Avila JCP, Santiago APSA, Amâncio RT, Galina A, Oliveira MF, Bozza FA (2008) Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med* 36:1925-1932.
8. Crouser ED, Julian MW, Joshi MS, Bauer JA, Wewers MD, Hart JM, Pfeiffer DR (2002) Cyclosporin A ameliorates mitochondrial ultrastructural injury in the ileum during acute endotoxemia. *Crit Care Med* 30: 2722-2728.
9. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine *Chest* 101:1644–1655.

10. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM (2004) Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 30: 536-555.
11. Adrie C, Bachelet M, Vayssier-Taussat M, Russo-Marie F, Bouchaert I, Adib-Conquy M, Cavillon JM, Pinsky MR, Dhainaut JF, Polla BS (2001) Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 389-395.
12. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M (2002) Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360: 219-223.
13. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL, Mindrinos MN, Davis RW, Tompkins RG, Lowry SF (2005) A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 437: 1032-1037.
14. Kantrow SP, Tatro LG, Piantadosi CA (2000) Oxidative stress and adenine nucleotide control of mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med*. 28: 251-260.

Figure Legends

Figure 1: Septic shock reduces specifically mitochondrial oxygen consumption associated to ATP synthesis in human PBMC. A- Representative traces of oxygen consumption from control (“C”, black line) and septic shock (“SS”, gray line) PBMC, with additions indicated in the figure (1 - 2 mM succinate + 0.5 mM ADP; 2 - 2 μ g/mL Oligomycin; 3 - 5 μ M FCCP). The phosphorylating state 3 respiration is indicated by the dashed lines. B- Evaluation of oxygen consumption rates of permeabilized PBMC from control (“C,” n=13, white bars) and septic shock patients (“SS”, n=13, gray bars) evaluated at the metabolic states 3, 4 (induced by oligomycin) and uncoupled (induced by FCCP). C - Respiratory control ratio (RCR) of PBMC from control (“C”, n=13, white bars) and septic shock patients (“SS”, n=13, gray bars) obtained from the data presented in B by dividing the rate of oxygen consumption at state 3 by the rate of oxygen consumption at state 4. Data are presented as box plots with median \pm maximum and minimum values for each condition. * $p < 0.01$ ANOVA, Tukey’s test and ** $p < 0.05$, Student’s t test.

Figure 2: Schematic representation of the proposed mechanism by which sepsis result in PBMC mitochondrial dysfunction. The boxes represent mitochondrial proteins and the hatched rectangle the inner mitochondrial membrane (IMM). IMS and MM mean intermembrane space and mitochondrial matrix, respectively. UQH2, ubiquinol; Cyt c, cytochrome c; Pi, inorganic phosphate. The colors are indicative of the involvement of different components on the observed effects of sepsis on PBMC mitochondrial function: white – not affected; gray - possibly affected. Essentially, succinate transport across IMM is mediated by the dicarboxylate carrier (DC) and electrons flow is provided by the redox reactions through complexes II to IV, which are not limited by SS. Energy coupling of the

electrons flowing through the ETC complexes generate a proton (H^+) gradient across IMM using molecular oxygen as an electron sink. The energy stored as the protonmotive force is then utilized by the F1Fo ATP synthase to allow ATP production. Since changes in proton permeability across IMM were not observed in the present work, proton transport mediated by uncoupling proteins (UCP) are also not involved. Instead, the data presented here show that SS affects components of the phosphorylation system, which include the F1Fo ATP synthase (F1Fo), the phosphate carrier (PC) and the adenine nucleotide translocator (ANT). Reduction in oxygen consumption associated to ATP synthesis during SS may be a result of single or multiple effects on different phosphorylation components.

Table 1 – Demographical characteristics, severity of illness, and outcome of control and septic shock patients

| | Control (n = 13) | Septic (n = 13) |
|--------------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Age (years) | 71.7 ± 11.0 | 69.1 ± 14.1 |
| Gender (male) | 7 | 7 |
| Type of admission (surgical/medical) | 11/2 | 10/3 |
| Site of infection | | |
| Abdominal | - | 8 |
| Pulmonary | - | 4 |
| Bloodstream | - | 1 |
| SAPS II (points) | 27.2 ± 10.2 | 57.8 ± 9.3 |
| SOFA on day 1 (points) | 1.8 ± 2.2 | 9.4 ± 3.2 |
| Mechanical ventilation | 0 | 13 |
| Renal support therapy | 0 | 6 |
| ICU length of stay (days) | 4.5 ± 4.2 | 25.8 ± 13.8 |
| 28 th day mortality | 0 | 6 |
| ICU mortality | 0 | 7 |

Continuous variables are expressed in mean ± standard deviation. Other variables are expressed in absolute values.

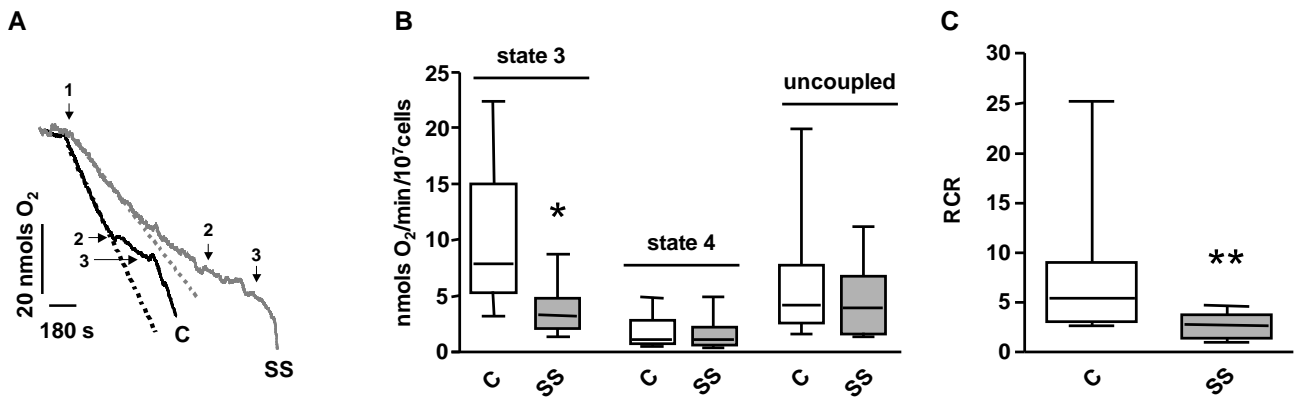


Figure 1

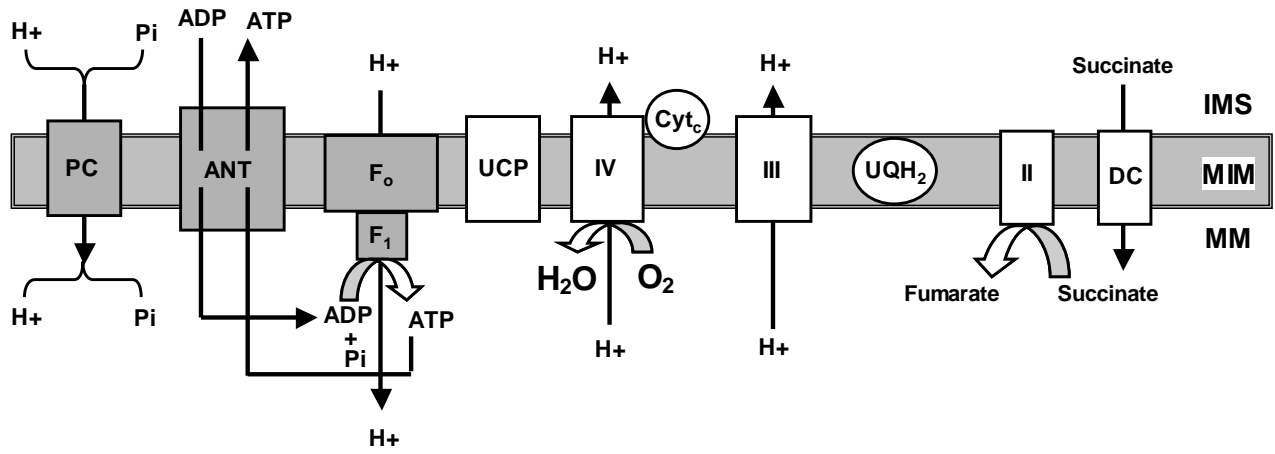


Figure 2

Parte III. Estudo sobre o efeito da sepse sobre a função mitocondrial em cérebro de camundongos:

A sepse é frequentemente complicada por disfunções do sistema nervoso central, com manifestações clínicas que variam desde confusão mental até coma, o que aumenta a morbidade e mortalidade dos pacientes acometidos. Alterações da função mitocondrial tem sido cada vez mais associadas com a disfunção orgânica na sepse, mas pouco se sabe sobre a fisiologia mitocondrial do cérebro durante a sepse.

Na presente tese realizamos o estudo da função mitocondrial cerebral utilizando um modelo de sepse clinicamente relevante (CLP) em camundongos. Uma série de parâmetros relacionados à função mitocondrial foram estudados neste modelo, tais como a quantificação da respiração em diferentes estados metabólicos, estimulado por substratos oxidáveis, a atividade dos complexos da CTE, o conteúdo cerebral de citocromos, a formação de potencial de membrana mitocondrial e a geração mitocondrial de peróxido de hidrogênio.

De forma geral, os dados apresentados neste trabalho demonstram que a sepse induz disfunções mitocondriais no cérebro, que envolvem essencialmente um aumento da permeabilidade da membrana interna mitocondrial a prótons resultando em desacoplamento da fosforilação oxidativa. Além disso, observamos também a diminuição do conteúdo de citocromos e da atividade da citocromo c oxidase no cérebro dos camundongos sépticos. Assim, as alterações da função mitocondrial observadas no cérebro dos camundongos sépticos podem comprometer a eficiência bioenergética deste tecido e contribuir desta forma para a progressão da encefalopatia séptica.

Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction

Joana da Costa P. d'Avila, MS; Ana Paula S. A. Santiago, MS; Rodrigo T. Amâncio, MD; Antonio Galina, PhD; Marcus F. Oliveira, PhD; Fernando A. Bozza, MD, PhD

Objective: Mitochondrial dysfunctions have been associated with the pathogenesis of sepsis. A systematic survey of mitochondrial function in brain tissues during sepsis is lacking. In the present work, we investigate brain mitochondrial function in a septic mouse model.

Design: Prospective animal study.

Setting: University research laboratory.

Subjects: Male Swiss mice, aged 6–8 wks.

Interventions: Mice were subjected to cecal ligation and perforation (sepsis group) with saline resuscitation or to sham operation (control group).

Measurements and Main Results: Oxygen consumption was measured polarographically in an oximeter. Brain homogenates from septic animals presented higher oxygen consumption in the absence of adenosine 5'-diphosphate (state 4) compared with control animals. The increase in state 4 respiration in animals in the cecal ligation and perforation group resulted in a drastic decrease in both respiratory control and adenosine 5'-diphosphate/oxygen ratios, indicating a reduction in the oxidative phos-

phorylation efficiency. Septic animals presented a significant increase in the recovery time of mitochondrial membrane potential on adenosine 5'-diphosphate addition compared with control animals, suggesting a proton leak through the inner mitochondrial membrane. The septic group presented a general reduction in the content of cytochromes. Moreover, the activity of cytochrome *c* oxidase was specifically and significantly decreased in the brain during sepsis. Hydrogen peroxide generation by brain mitochondria from septic mice did not respond to substrates of electron transport chain or to adenosine 5'-diphosphate, showing that mitochondrial function may be compromised in a critical level in the brain during sepsis.

Conclusions: The mitochondrial dysfunctions demonstrated here indicate that uncoupling of oxidative phosphorylation takes place in the brain of septic mice, compromising tissue bioenergetic efficiency. (Crit Care Med 2008; 36:●●●–●●●)

KEY WORDS: energy metabolism; MODS; mitochondria; sepsis; brain; oxidative stress

The evolution to multiorgan dysfunction syndrome is a critical determinant of mortality in septic patients, and the mechanisms by which sepsis leads to organ dysfunction remain to be established. Tissue hypoxia has long been considered the putative mechanism of multiorgan dysfunction syndrome (1). In recent decades, there has been an intense controversy about the benefits of tissue oxygen delivery strategies during sepsis (2–4), and recently, it has been shown that early intervention aimed

at increasing tissue oxygen delivery improves the outcome of septic patients (5).

Although the determinants of tissue metabolic demands in early sepsis are not completely known, there is strong evidence indicating that mitochondrial function is affected during sepsis (6, 7). The functional changes in mitochondria may be, ultimately, a consequence of either electron transport chain impairment or loss of the membrane potential, which may contribute to organ injury and cell death (8–12).

During sepsis, the brain is one of the first organs to be affected, and sepsis-associated encephalopathy is frequent but infrequently recognized (13, 14). An encephalopathy of variable severity has been found to occur in 9% to 71% of septic patients and is associated with higher in-hospital mortality (15, 16). In addition, *post mortem* analysis of septic patients revealed a high frequency of brain lesions (17). In animal models of polymicrobial sepsis, acute encephalopathy takes place, and survivors present with cognitive impairment that could be secondary to central nervous system damage (18). There is evidence suggesting that short-term oxidative damage in brains of rats subjected to cecal ligation and perforation (CLP) could contribute to the development of central nervous system symptoms during the progression of sepsis (19). In fact, brain tissues have unique characteristics that make them especially susceptible to damage during sepsis, such as their high oxygen consumption rate and low levels of antioxidant defenses (20).

Thus, in the present work, we investigated mitochondrial function in the

From the Laboratório de Bioquímica Redox, Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia (JdCPdA, MFO), Laboratório de Bioenergética Adaptativa, Programa de Biofísica e Bioquímica Celular (APSAS, AG), Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Brazil; and the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas and Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil (RTA, FAB).

The authors have not disclosed any potential conflicts of interest.

Supported, in part, by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and DECIT/Ministério da Saúde (MS) through Edital Acidentes e Trauma 2004, CNPq through

Edital Universal 2003 and 2006, Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB, Brazil) through Prêmio Antônio Luiz Vianna 2004 and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil) through APQ-1 and Fundação Oswaldo Cruz - PAPES IV (Brazil). Drs. Oliveira and Galina are research scholars from CNPq.

Drs. Oliveira and Bozza contributed equally to this work.

For information regarding this article, E-mail: maroli@bioqmed.ufrj.br or fbozza@hucff.ufrj.br.

Copyright © 2008 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181760c4b

brains of septic mice. The data presented here support the notion that during sepsis, an increase in proton permeability across the inner mitochondrial membrane takes place in the brain, reducing the efficiency of oxidative phosphorylation due to mitochondrial uncoupling.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male Swiss mice (Oswaldo Cruz Foundation breeding unit) weighing 20–25 g were used. The animals were kept at a constant temperature (25°C), with free access to pelleted diet and water in a room with a 12-hr light/dark cycle. Animals were maintained according to international and local animal care guidelines. The present protocol was approved by the Oswaldo Cruz Foundation Animal Welfare Committee.

Cecal Ligation and Perforation. CLP was performed as previously described, with minor modifications (21, 22). Briefly, male Swiss mice were anesthetized with ketamine (80 mg/kg, Ketamin, Cristália) and thiopental (30 mg/kg, Thiopental, Cristália) diluted in sterile saline and administered intraperitoneally (0.2 mL). Laparotomy was performed with a 2-cm midline incision through the linea alba; the cecum was exposed and carefully ligated with sterile 3-0 silk below the ileocecal junction, with care to avoid bowel obstruction. The cecum was punctured once with an 18-gauge needle and was then gently squeezed to empty its content through the puncture. The cecum was then returned to the peritoneal cavity, and the abdominal muscle and skin incisions were closed in layers using a 3-0 nylon suture line. Immediately after the surgery, 0.5 mL of sterile saline was administered subcutaneously to the animals for volume resuscitation. Mice in the sham operation group were subjected to identical procedures, except that ligation and puncture of the cecum were omitted. Animals subjected to CLP developed early signs of sepsis, including lethargy, piloerection, and diarrhea. The lethality of our model was about 40% in the first 24 hrs and 60% in 144 hrs (22). After 24 hrs, CLP mice were killed by cervical dislocation, and brain tissues were obtained.

Preparation of Brain Homogenates. Brains were removed, rinsed with ice-cold homogenate buffer (10 mM Tris buffer pH 7.4, 0.32 M sucrose, and 1 mM EGTA), minced, and manually homogenized in a 30-mL Teflon glass potter with a volume of buffer adjusted to provide a 10% (wt/vol) final concentration (typically 4 mL) as previously described (23). All procedures were performed on ice. Protein content was determined by the Folin–Lowry method using bovine serum albumin as standard (24).

Mitochondria Isolation. Mitochondria were isolated from brain homogenates using a method previously described in the literature (25). The homogenate was centrifuged for 3

mins at 4,000 rpm in a Hitachi Himac SCR20B RPR 20-2 rotor to remove cell debris. After centrifugation, the supernatant was centrifuged for 10 mins at 16,000 rpm. The pellet was resuspended in 5 mL of homogenate buffer containing 15% Percoll and a discontinuous gradient was prepared with 40% under 23% and 15% Percoll. The gradient was centrifuged at 19,000 rpm for 5 mins, and the mitochondrial fraction between 40% and 23% was collected and centrifuged at 14,000 rpm for 10 mins to wash the Percoll. The pellet was suspended in ice-cold homogenate buffer modified with 0.32 M mannitol instead of sucrose, plus 0.2% bovine serum albumin, fatty acid free. Mitochondria preparation was kept at 4°C during the whole isolation procedure, and protein was determined by the Folin–Lowry method, using bovine serum albumin as a standard (24).

Oxygen Consumption Measurements. Oxygen concentrations in the medium were measured polarographically using an oximeter fitted with a water-jacketed, Clark-type electrode (Yellow Springs Instrument 5300) in a 1.5-mL reaction vessel. Oxygen consumption studies were carried out in a respiration buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.32 M mannitol, 5 mM inorganic phosphate, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) modified from the literature (23). Samples of brain homogenates (650 µg/mL) were incubated with respiration buffer inside the oximeter cuvette under stirring. State 3 respiration was induced by addition of Complex I substrates pyruvate (10 mM) and malate (10 mM), plus 100 µM adenosine 5'-diphosphate (ADP) to the closed cuvette using a Hamilton syringe. State 4 respiration was reached when all ADP was metabolized to adenosine triphosphate (ATP). Then, after the first induction of state 4 respiration, 200 µM ADP was added to the cuvette, stimulating oxygen consumption during state 3, which was followed by a second state 4 respiration. Respiratory control ratio values were obtained by dividing the rate of oxygen consumption at state 3 by the rate of oxygen consumption at state 4 (26). After a stable state 4 respiration, the addition of 5 µM carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) induced a maximal uncoupled response.

Determination of Mitochondrial Membrane Potential. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was measured by using the cationic dye safranin O (Sigma), which accumulates inside the negatively charged mitochondrial matrix and quenches its fluorescence signal (27). Mitochondria (0.3 mg protein/mL) were incubated in the standard respiration buffer supplemented with 10 µM safranin. FCCP (5 µM) was used as a positive control to collapse $\Delta\Psi_m$. Fluorescence was detected with an excitation wavelength of 495 nm (slit 5 nm) and an emission wavelength of 586 nm (slit 5 nm) using a Hitachi (Tokyo, Japan) model F-3010 spectrofluorometer. Data are reported as arbitrary fluorescence units. Each experiment was repeated at least

three times with different mitochondrial preparations isolated from Percoll gradient centrifugation (25).

Visible Absorption Spectra of Mitochondrial Cytochromes. Estimations of cytochrome content were carried out in brain homogenates by using a GBC spectrophotometer (UV/VIS 920) at 1 sec of integration time and data recording at each 0.85-nm interval. Homogenate protein (0.2 mg) from sham and CLP brains was incubated in a 100 mM phosphate buffer containing 0.1% Triton X-100, and the absorption light wavelength scan of cytochromes was performed (oxidized) between 500 and 700 nm. Sodium dithionite was added to the cuvette, and differential spectra (reduced minus oxidized) were calculated in the GBC Spectral Software (GBC, Australia).

Electron Transport Chain Complex Activities. The mitochondrial Complexes I–III and IV activities were determined, as described previously in the literature (28, 29), at 37°C. For nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)–cytochrome-c reductase (Complex I–III) activity, brain homogenates were briefly centrifuged for 10 secs to clarify the sample, protein content was determined, and the samples were kept at –80°C until analysis. The sample (about 0.3 mg of protein) was added to 100 mM phosphate buffer containing 50 µM cytochrome c³⁺ and 1 mM potassium cyanide and the rotenone-sensitive NADH–cytochrome-c reductase activity was determined at 550 nm. For cytochrome c oxidase (Complex IV) activity, sample (about 0.3 mg of protein) was added to an oximeter cuvette, the potassium cyanide-sensitive oxygen consumption induced by tetramethylparaphenylenediamine (0.5 mM), and ascorbate (5 mM) was determined.

Hydrogen Peroxide Production in Brain Homogenates. Hydrogen peroxide (H₂O₂) production was measured using Amplex Red (Molecular Probes) and horseradish peroxidase, based on a previously described method, slightly modified (30). Fresh brain homogenates (0.3 mg) were incubated in respiration buffer containing 5 µM Amplex Red reagent and 3 units/mL horseradish peroxidase. Fluorescence was monitored at excitation and emission wavelengths of 563 nm (slit 5 nm) and 587 nm (slit 5 nm) in a Varian spectrofluorometer (Cary Eclipse Model). Calibration was performed by the addition of known quantities of H₂O₂. Succinate (10 mM) was added as the electron donor to induce state 2 respiration, leading to a polarization of $\Delta\Psi_m$ and increase in H₂O₂ production. ADP (100 µM) was added to the cuvette, inducing state 3 respiration and decreasing H₂O₂ production. Oligomycin (1 µg/mL) was used to induce state 4–like respiration and FCCP (5 µM) used to induce uncoupled respiration and minimum H₂O₂ production.

Statistical Analysis. Comparisons between groups were done by the nonpaired Student's *t*-test or one-way analysis of variance, and *a posteriori* Tukey's test for pair-wise compari-

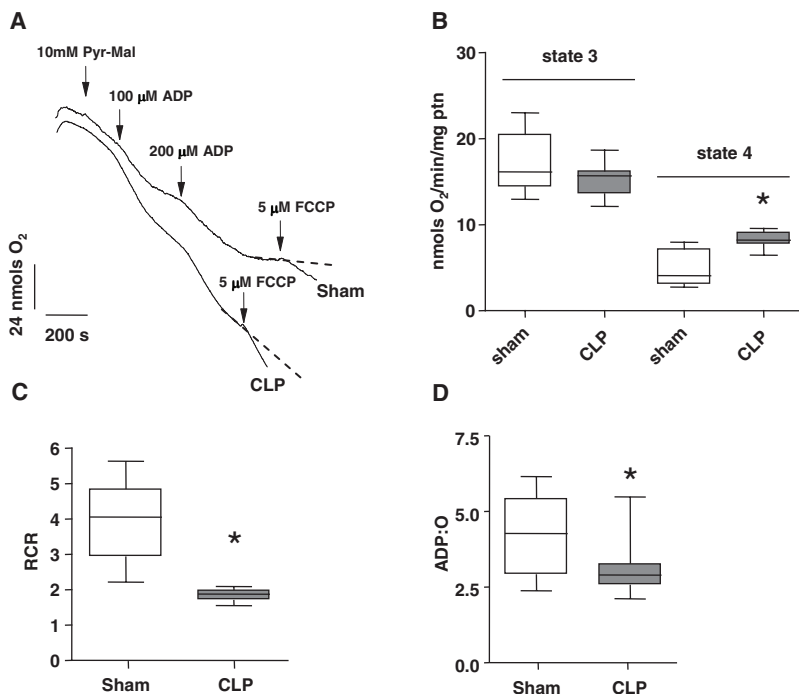


Figure 1. Sepsis-induced mitochondrial uncoupling of oxidative phosphorylation in brain homogenates. *A*, representative traces of oxygen consumption of sham and cecal ligation and perforation (CLP) mice, with additions as indicated. *Pyr-Mal*, pyruvate and malate; *ADP*, adenosine 5'-diphosphate; *FCCP*, carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone. *Dashed lines* indicate the rate of state 4 respiration utilized for comparisons between sham and CLP samples. *B*, oxygen consumption rate of sham ($n = 8$, white bars) and CLP ($n = 9$, gray bars) animals evaluated at metabolic state 3 and state 4. Brain homogenates (650 $\mu\text{g/mL}$) were incubated at the oxygen meter cuvette with 10 mM pyruvate and malate and 100–200 μM ADP, inducing state 3 respiration. The state 4 respiration was reached in the absence of ADP ($*p < .05$ analysis of variance, Tukey's test). *C*, respiratory control ratio (RCR) of mitochondria from sham ($n = 8$, white bars) and CLP ($n = 9$, gray bars) mice obtained from the data presented in *A* by dividing the rate of oxygen consumption at state 3 by the rate of oxygen consumption at state 4 ($*p = .0001$, Student's *t*-test). *D*, ADP/oxygen ratio (ADP:O) of mitochondria from sham ($n = 13$, white bars) and CLP ($n = 15$, gray bars) mice obtained by measuring the amount of oxygen (nanomoles) consumed after addition of 0.15 mM of ADP ($*p = .03$, Student's *t*-test). Data are presented as box plots with median \pm maximum and minimum values for each condition. *ptn*, protein.

sons. Differences of $p < .05$ were considered to be significant. Student's *t*-test, analysis of variance, and Tukey's test were performed by GraphPad Prism, version 4.00, for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

Sepsis Causes Mitochondrial Uncoupling in Mice Brain. Oxygen consumption in brain homogenates was measured from sham and CLP mice in two distinct metabolic states of mitochondria: state 3, in which respiration is coupled to ATP synthesis, and state 4, which is defined as the respiration not associated to ATP synthesis (Fig. 1). Figure 1A shows typical traces of oxygen consumption induced by mitochondrial respiratory substrates in the two experimental groups. We observed that the oxygen consumption rate after addition of ADP (state 3) was essentially the same between the two experimen-

tal groups (Fig. 1A), and respiration was completely inhibited by cyanide (data not shown). However, after all of the ADP is converted to ATP, the oxygen consumption rate (state 4) was higher in CLP than in sham animals (Fig. 1A, traces indicated by open arrowheads). Comparison between the respiratory rates of the two metabolic states is shown in Figure 1B. Indeed, in septic animals, there were no significant changes in the state 3 respiration compared with sham (20.016 ± 2.52 vs. 21.456 ± 1.54 nmol oxygen $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein), whereas state 4 respiration was significantly higher in CLP animals compared with sham animals (12.456 ± 1.15 vs. 8.064 ± 1.58 nmol oxygen $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein, $p < .05$), suggesting an uncoupling of oxidative phosphorylation. The respiratory control ratio, an index of mitochondrial coupling, was significantly reduced in septic mice compared with

sham animals (1.67 ± 0.11 vs. 3.3 ± 0.59) (Fig. 1C). An index of efficiency of oxidative phosphorylation was evaluated, the ADP/oxygen ratio, which is defined by the number of moles of ADP phosphorylated to ATP per moles of oxygen consumed (31). Brain homogenates of CLP mice exhibited a reduced ADP/oxygen ratio compared with sham (2.90 ± 0.24 vs. 4.27 ± 0.36 ; $p = .03$) (Fig. 1D). Thus, this set of data suggest that in sepsis, the proportion of oxygen used for respiration that is not associated to ATP synthesis increases in the brain as a result of an uncoupling of oxidative phosphorylation.

Sepsis Affects the Mitochondrial Membrane Potential in Mice Brain. Figure 2A shows typical traces of fluorescence signal of the probe safranin O when Percoll-purified mitochondria were incubated with a respiratory substrate. After addition of succinate, there was a huge decrease in safranin fluorescence in both groups because of an increase in the $\Delta\Psi\text{m}$. After the addition of ADP, the fluorescence signal of safranin increased transiently in both experimental groups because of a partial depolarization of $\Delta\Psi\text{m}$ coupled to ATP synthesis. However, the extent by which $\Delta\Psi\text{m}$ is dissipated by the same amount of ADP is different between the groups, suggesting that $\Delta\Psi\text{m}$ could be dissipated in septic brain (Fig. 2B). The recovery time of $\Delta\Psi\text{m}$ on ADP addition is higher in CLP mice compared with sham animals (1.509 ± 0.15 vs. 1.068 ± 0.13 secs of state 3-nmol ADP $^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein), as shown in Figure 2B, indicating that the mechanisms that regulate $\Delta\Psi\text{m}$ and oxidative phosphorylation efficiency are affected in sepsis.

Sepsis Causes Cytochromes Depletion and Reduced Complex IV Activity. Figure 3 shows typical light absorption spectra of mitochondrial cytochromes. We observed a reduction of cytochrome *b* (near 560 nm), cytochrome *c* (near 551 nm), and cytochrome *a+a₃* (near 604 nm) absorption in septic animals, indicating that in sepsis, there is a depletion of the content of cytochromes. To check if the reduction in cytochromes content would affect mitochondrial electron transfer, we determined the activity of Complexes I–III and Complex IV (Fig. 4). In our experimental conditions, we did not detect differences in the activities of Complexes I–III during sepsis (sham, 26.35 ± 3.24 nmol cytochrome *c* $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein; CLP, 24.00 ± 0.49 nmol cytochrome *c* $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein) (Fig. 4A). On the other hand, there was a clear inhibition in Complex IV activity in the

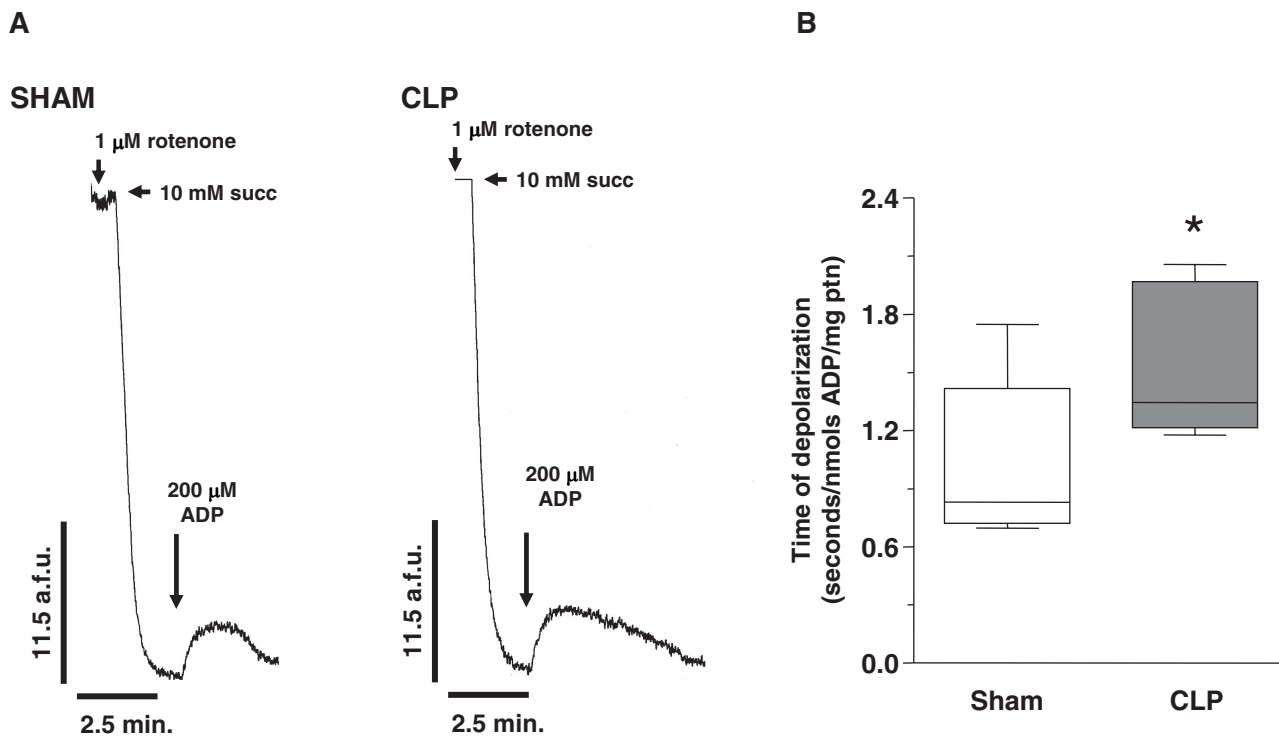


Figure 2. Sepsis induced changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). *A*, traces of safranin O fluorescence of Percoll-purified brain mitochondria from sham and cecal ligation and perforation (CLP) mice. Brain mitochondria (200 μ g/mL) were incubated at the fluorometer cuvette with 10 mM succinate (succ) and 1 μ M rotenone, inducing state 2 respiration. Sequential addition of adenosine 5'-diphosphate (ADP, 0.2 mM) was made to induce a transient state 3 respiration and partial $\Delta\Psi_m$ dissipation. *B*, the time of state 3 respiration induced by ADP was measured in brain mitochondria from sham ($n = 9$, white bars) and CLP ($n = 6$, gray bars) animals (* $p < .01$, Student's *t*-test). Data are presented as box plots with median \pm maximum and minimum values for each condition. *a.f.u.*, arbitrary fluorescence units; *ptn*, protein.

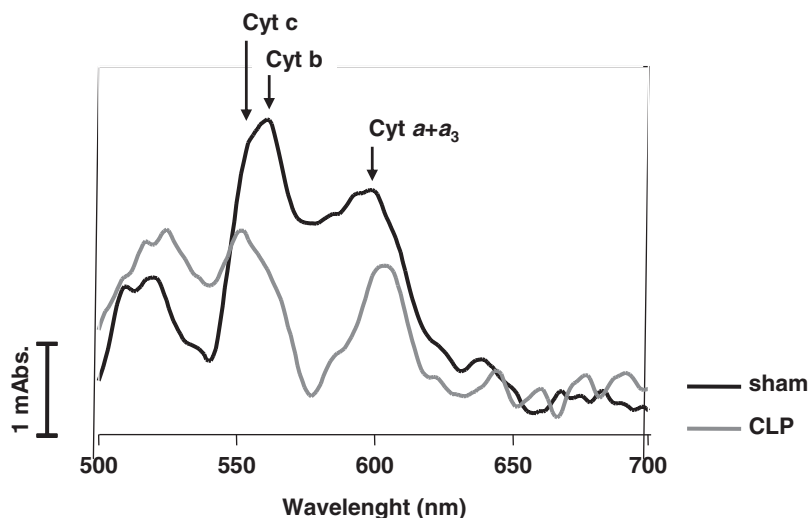


Figure 3. Sepsis-promoted depletion of mitochondrial cytochromes (*Cyt*). Representative absorption light differential spectra of brain homogenates from sham (black line) and cecal ligation and perforation (CLP; gray line) mice are shown.

CLP group compared with sham (31.80 ± 1.55 vs. 40.45 ± 3.31 nmol oxygen \cdot min $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$ protein) (Fig. 4B).

Mitochondrial Hydrogen Peroxide Generation in Septic Brain Is Reduced. Figure 5A shows typical traces of mitochondrial H₂O₂ production both in sham

and CLP brains. We observed that basal H₂O₂ production (state 1) was not different between the experimental groups. In brains from sham animals, succinate addition stimulated the H₂O₂ formation because of an increase in membrane potential in a nonphosphorylating condition

(state 2) (Fig. 5B). As expected, ADP-induced state 3 respiration inhibited H₂O₂ formation in brains from sham animals (Fig. 5B) because of dissipation of membrane potential through ATP synthase activity. Interestingly, we observed that in brains from CLP mice, H₂O₂ production was not stimulated by succinate addition (Fig. 5B). We also observed that oligomycin-induced state 4–like respiration failed to induce H₂O₂ generation in CLP mice, suggesting that uncoupling of oxidative phosphorylation impairs the maintenance of membrane potential, which in turn reduces H₂O₂ production (Fig. 5B).

DISCUSSION

Several lines of evidence indicate a critical role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis both of acute and chronic diseases in the brain (20). Despite the recent efforts to understand the involvement of mitochondria in the development of brain diseases, a systematic survey of mitochondrial function in brain tissues during sepsis is lacking. The present article is the first demonstration

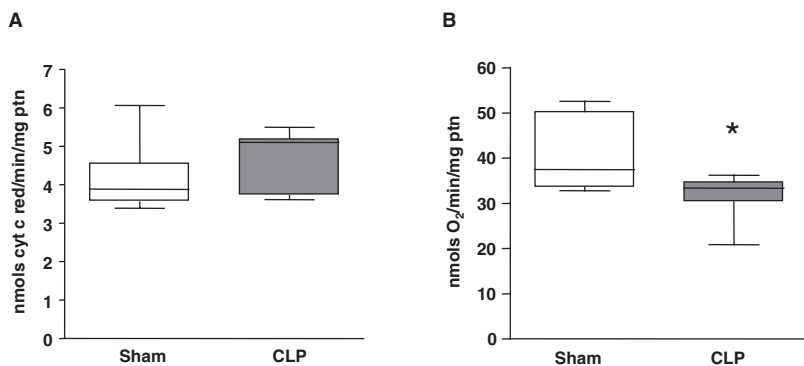


Figure 4. Inhibition of cytochrome *c* oxidase in sepsis. *A*, activity of Complexes I–III from mitochondrial electron transport chain were evaluated in brain homogenates (0.35 mg/mL) from sham ($n = 11$, white bars) and cecal ligation and perforation (CLP; $n = 9$, gray bars) mice by measuring the absorbance at 550 nm of cytochrome *c* (0.05 mM) reduction (*cyt c red*) induced by reduced nicotinamide adenine dinucleotide (0.2 mM) inhibited by rotenone (2 μ M). All of the measurements were made in the presence of 1 mM potassium cyanide. *B*, activity of cytochrome *c* oxidase from mitochondrial electron transport chain was evaluated in brain homogenates (0.2–0.4 mg/mL) from sham ($n = 6$, white bars) and CLP ($n = 9$, gray bars) mice by measuring the oxygen consumption induced by 0.5 mM tetramethylparaphenylenediamine and 5 mM ascorbate and inhibited by 1 mM potassium cyanide ($*p = .02$, Student's *t*-test). Data are presented as box plots with median \pm maximum and minimum values for each condition. *ptn*, protein.

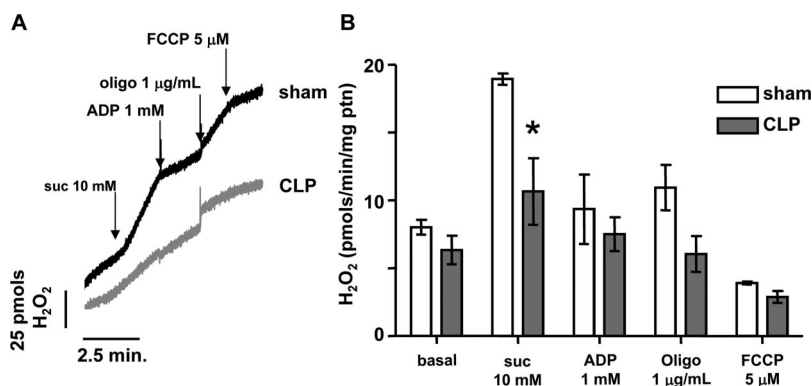


Figure 5. Hydrogen peroxide (H_2O_2) formation in brain homogenates from septic mice is not regulated by respiratory substrate and adenosine 5'-diphosphate (ADP). *A*, representative traces of H_2O_2 formation in brain homogenates (0.2 mg/mL) from sham (black line) and cecal ligation and perforation (CLP; gray line) mice were assessed fluorometrically through the oxidation of the probe Amplex Red (2 μ M) induced by succinate (*suc*, 10 mM). State 3 respiration was induced by addition of 1 mM ADP and state 4–like respiration was induced by 2 μ g/mL oligomycin (*oligo*). Carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP, 5 μ M) was added to evaluate H_2O_2 generation during the uncoupled state. *B*, H_2O_2 generation in four metabolic states of mitochondria was evaluated in brain homogenates of sham ($n = 3$, white bars) and CLP ($n = 3$, gray bars) mice ($*p = .03$, Student's *t*-test). Bars represent mean \pm SEM, and similar results were obtained with preparations from different animals. *ptn*, protein.

of mitochondrial dysfunction in the brain during sepsis, showing changes in oxygen consumption, mitochondrial complex activities, contents of cytochromes, membrane potential, and H_2O_2 generation. The data presented here are schematically summarized in Figure 6. The changes in brain mitochondrial function observed in our model of sepsis were essentially related to an increase in proton permeability across the inner mitochondrial membrane, leading to a reduction of oxidative phosphorylation efficiency due

to mitochondrial uncoupling (Figs. 1, 2, and 5). This can be proposed based on an increase in oxygen consumption during state 4 respiration (Fig. 1), increased time of depolarization of $\Delta\Psi_m$ induced by ADP (Fig. 2), and also by the reduced capacity of mitochondria to generate H_2O_2 after induction by respiratory substrates (Fig. 5). Supporting these observations, an increase in the state 4 respiration and a reduction in ADP/oxygen ratio were also demonstrated by other groups in the liver (10, 32, 33) and in the

diaphragm (34) during endotoxemia. We observed changes in the $\Delta\Psi_m$ after ADP addition, and the time of repolarization of $\Delta\Psi_m$ was significantly increased in CLP animals, suggesting an increase of proton permeability across the inner mitochondrial membrane, even during state 3 (Fig. 2). In agreement with these data, the ADP/oxygen ratio in the septic brain presented a significant reduction, indicating that, despite not affecting the rate of oxygen consumption during state 3 respiration, the increase in proton permeability during state 3 respiration induced by sepsis affects the efficiency of oxidative phosphorylation (Fig. 1D). It is important to note that a loss of $\Delta\Psi_m$ has been shown to be directly associated to processes such as mitochondrial permeability transition (MPT), mitochondrial swelling, and apoptosis (35). Moreover, Adrie et al. (8) have shown in peripheral blood monocytes of septic patients both a loss of $\Delta\Psi_m$ and the appearance of apoptosis markers, which were related to the severity of sepsis.

The inhibition of the electron transport, particularly at the Complex I site, is a hallmark of mitochondrial dysfunction in sepsis (9, 36), and inhibition of Complex IV has also been detected in some studies (37, 38). The impairment of the electron flux in mitochondria results in a reduction in oxygen utilization, which was hypothesized as the *cytopathic hypoxia* concept (39). However, the data presented here indicate that electron transport chain function is maintained in the septic brain, despite many reports showing inhibition of state 3 respiration or inhibition of complex activities in different tissues (9, 10, 32, 37). Indeed, we did not find inhibition of Complex I activity but, instead, a reduction of approximately 30% of Complex IV activity (Fig. 4). This inhibition of Complex IV could involve mediators such as nitric oxide (40) and carbon monoxide (41). Interestingly, Brealey et al. (9) established an association between Complex I inhibition and sepsis severity. They also found a direct correlation between the levels of nitric oxide metabolites and Complex I inhibition, which may be mediated by peroxynitrite (28, 42). The literature has shown that the involvement of nitric oxide or peroxynitrite, or both, on Complex I activity seems to be different in the brain compared with other tissues (40). There is a general consensus that one of the protective components against oxidative damage of Complex I is the presence of reduced glutathione, an endogenous an-

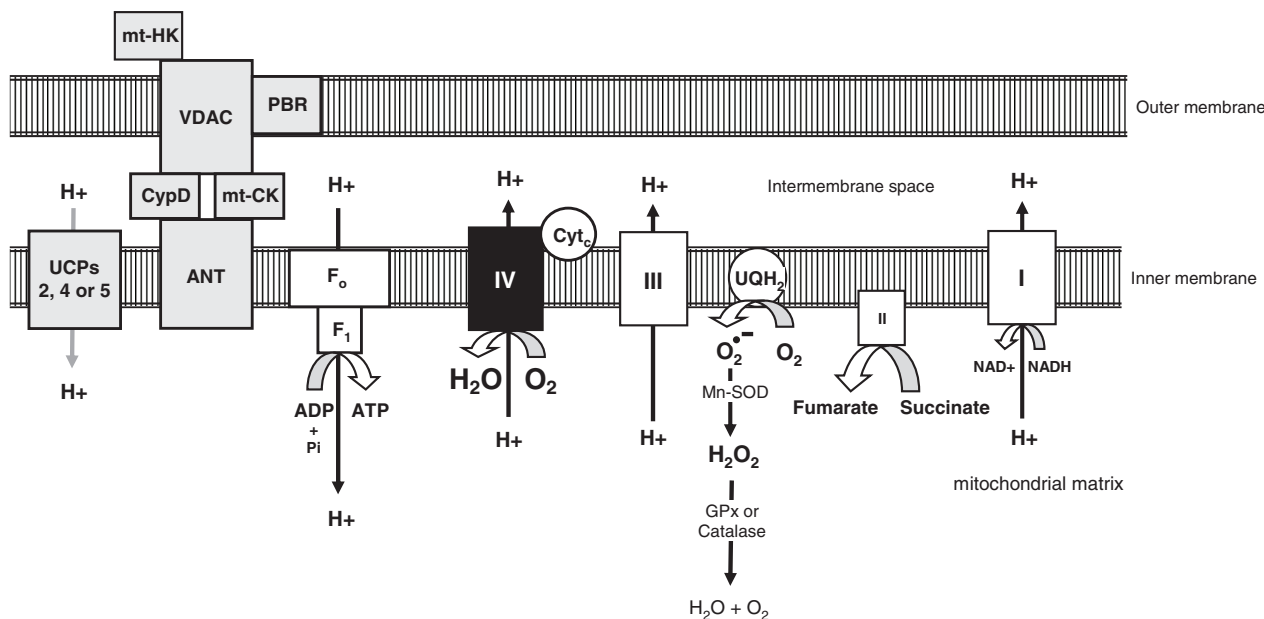


Figure 6. Schematic representation of the proposed mechanisms by which sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. The *boxes* represent mitochondrial proteins and the *hatched rectangles* the inner and outer mitochondrial membranes. The boxes' colors are indicative of their involvement in septic brain: *white* is not affected, *gray* is possibly affected, and *black* is affected. The complexes of the electron transport chain generate a proton (H^+) gradient across the inner mitochondrial membrane using the oxygen as an electron sink. It is possible that proteins involved in the maintenance of the membrane potential ($\Delta\Psi_m$) would be affected during sepsis. In the brain and other tissues, hexokinase (*HK*) is bound to the outer mitochondrial membrane through an association with the voltage-dependent anion channel (*VDAC*). The octameric form of mitochondrial creatine kinase (*mt-CK*) localizes in the intermembrane space, through an association with the *VDAC* and the adenine nucleotide translocator (*ANT*) and with cyclophilin D (*CypD*) and the peripheral benzodiazepine receptor (*PBR*). *Open arrows* and *black lines* indicate a high flux of metabolites, whereas *gray lines* represent low flux. *Numbers* represent the complexes of the respiratory electron chain. *UQ*, ubiquinone; *Cyt c*, cytochrome *c*; *UCP-2*, *UCP-4*, or *UCP-5*, uncoupling protein isoforms 2, 4, or 5; *Mn-SOD*, manganese superoxide dismutase; *GPx*, glutathione peroxidase; *F₁F₀*, *F₁F₀*-adenosine triphosphate (*ATP*) synthase; *NAD⁺*, oxidized nicotinamide adenine dinucleotide; *NADH*, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; *Pi*, inorganic phosphate.

toxoidant molecule that is particularly important in brain physiology (43). In fact, brain glutathione metabolism is essential to maintain mitochondrial electron transport chain complex activities (44–46). Whatever the mechanism, Kadoi and Goto (47) have shown that nitric oxide synthase inhibitors restored hemodynamic changes but did not lead to an improvement of septic encephalopathy. Therefore, Complex I inhibition may not be of central importance to the development of brain mitochondrial uncoupling (Figs. 5 and 6). The overall picture of mitochondrial dysfunctions in sepsis is complex, and sometimes, the conclusions established go in opposite directions. Possibly, much of this controversy can be associated with factors such as differences in experimental settings and choice of the model, the tissue, or time of disease progression.

Despite a reduction in cytochrome levels observed in the septic brain (Fig. 3), an impairment of complex activities was only detected at the cytochrome *c* oxidase level (Fig. 4). Interestingly, depletion of cytochromes was also observed in other tissues during sepsis (48). Thus, it

seems that cytochrome depletion, in our model, was not enough to compromise the electron flux in septic brain mitochondria, but the mechanisms underlying this process are not known. A biochemical threshold effect could explain why depletion of cytochromes occurs without any apparent effect on electron flux during state 3 respiration (49, 50).

Mechanistically, we can speculate about the pathways involved in the uncoupling of oxidative phosphorylation observed in our model of sepsis in brain. The activation of uncoupling proteins (UCPs) or the opening of mitochondrial permeability transition pores would result in a reduction of $\Delta\Psi_m$, leading to an inefficiency of oxidative phosphorylation. In this regard, the early oxidative stress condition, observed in previous studies of the septic brain (19), could be responsible for the uncoupling of oxidative phosphorylation observed here, through the activation of UCP. Echtay et al. (51, 52) have shown that superoxide radical and 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, are both able to activate UCP. Thus, it is tempting to propose that in early sepsis, products of lipid peroxida-

tion might accumulate to levels that would activate brain isoforms of UCP, increasing the proton permeability across the inner mitochondrial membrane. Interestingly, Sun et al. (53) have recently demonstrated that UCP-3 expression was increased in the muscle of CLP rats and, although brain essentially expresses UCPs 2, 4, and 5 instead of UCP-3, it is conceivable that expression of other UCP isoforms in brain would be increased. Thus, UCP activation could explain the increase in oxygen consumption in state 4 (Fig. 1), the reduced respiratory control and the ADP/oxygen ratios (Fig. 1), and the reduction in H_2O_2 generation (Fig. 5) (51, 52). However, we cannot exclude the possibility of an altered proton permeability mediated by other mechanisms independent of UCP, such as the opening of the mitochondrial permeability transition pore. Regardless of the mechanisms involved in mitochondrial uncoupling, it is important to note that mitochondrial reactive oxygen species production is dependent on the $\Delta\Psi_m$ in such a way that small changes in membrane potential could result in drastic changes in H_2O_2 production (54, 55).

Despite the interesting findings presented here, we are aware that the observed effects in brain mitochondria during sepsis were detected in whole homogenates, and it is not possible to determine whether mitochondrial uncoupling occurs diffusely or is restricted to specific areas of the brain. In addition, we have no information about which cell types are affected during sepsis. Finally, although an encephalopathy of variable severity is present in septic patients, it is not clear what the relationship between mitochondrial dysfunction and the degree of cognitive or motor impairment is during sepsis. Experiments directed to investigate these issues in murine models are currently under way in our laboratory.

Taken together, the results presented here show that brain mitochondrial function is affected during sepsis due to an increase in proton permeability of the inner membrane, leading to a reduction in oxidative phosphorylation efficiency. Further studies under way are aimed to establish the early events that lead to a lower oxidative phosphorylation efficiency in the brain during sepsis. Once confirmed in a clinical setting, changes in brain energy metabolism resulting from mitochondrial dysfunctions may represent a new mechanism for understanding septic encephalopathy and may become an emerging target for the development of therapies for this condition.

CONCLUSIONS

Mitochondrial dysfunction is present in brain tissue during sepsis and is characterized by an uncoupling of oxidative phosphorylation, which may compromise the tissue bioenergetic efficiency.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Hugo Castro-Faria-Neto and Ms. Juliette Savin for critical revision of the manuscript and Andrew S. Weyrich and Guy A. Zimmerman for critical review of the manuscript.

REFERENCES

- Fink MP, Evans TW: Mechanisms of organ dysfunction in critical illness: Report from a Round Table Conference held in Brussels. *Intensive Care Med* 2002; 28:369–375
- Gattinoni L, Brazzi L, Pelosi P, et al: A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients: SvO₂ Collaborative Group. *N Engl J Med* 1995; 333:1025–1032
- Hayes MA, Timmins AC, Yau EH, et al: Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: Influence of treatment and relationship to outcome. *Crit Care Med* 1997; 25:926–936
- Kern JW, Shoemaker WC: Meta-analysis of hemodynamic optimization in high-risk patients. *Crit Care Med* 2002; 30:1686–1692
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345:1368–1377
- Crouser ED: Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndromes. *Mitochondrion* 2004; 4:729–741
- Protti A, Singer M: Bench-to bedside review: Potential strategies to protect or reverse mitochondrial dysfunction in sepsis-induced organ failure. *Crit Care Med* 2006; 10:228
- Adrie C, Bachelet M, Vayssier-Taussat M, et al: Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:389–395
- Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al: Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002; 360:219–223
- Crouser ED, Julian MW, Blaho DV, et al: Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit Care Med* 2002; 30:276–284
- Porta F, Takala J, Weikert C, et al: Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. *Crit Care Med* 2006; 10:R118
- Lin MT, Beal MF: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443:787–795
- Milbrandt EB, Angus DC: Bench-to bedside review: Critical illness-associated cognitive dysfunction—mechanisms, markers, and emerging therapeutics. *Crit Care Med* 2006; 10:238
- Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D: Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med* 2007; 33:941–950
- Sprung CL, Peduzzi PN, Shatney CH, et al: Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome: The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. *Crit Care Med* 1990; 18:801–806
- Eidelman LA, Putterman D, Putterman C, et al: The spectrum of septic encephalopathy: Definitions, etiologies, and mortalities. *JAMA* 1996; 275:470–473
- Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, et al: The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol* 2004; 14:21–33
- Barichello T, Martins MR, Reinke A, et al: Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med* 2005; 33:221–223
- Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, et al: Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med* 2006; 34:886–889
- Halliwel B: Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem* 2006; 97:1634–1658
- Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, et al: Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 1983; 94:331–335
- Vianna RC, Gomes RN, Bozza FA, et al: Antibiotic treatment in a murine model of sepsis: Impact on cytokines and endotoxin release. *Shock* 2004; 21:115–120
- Sims NR, Blass JP: Expression of classical mitochondrial respiratory responses in homogenates of rat forebrain. *J Neurochem* 1986; 47:496–505
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265–275
- Sims NR: Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J Neurochem* 1990; 55:698–707
- Chance B, Williams GR: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation: I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem* 1955; 217:383–393
- Akerman KE, Wikstrom MK: Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 1976; 68:191–197
- Cassina A, Radi R: Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328:309–316
- Navarro A, Boveris A: Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287:R1244–R1249
- Votyakova TV, Reynolds IJ: Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: Interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Arch Biochem Biophys* 2004; 431:138–144
- Nicholls DG, Ferguson SJ: Bioenergetics 3. Third Edition. London, Academic Press, 2002
- Schumer W, Das Gupta TK, Moss GS, et al: Effect of endotoxemia on liver cell mitochondria in man. *Ann Surg* 1970; 171:875–882
- Porta F, Takala J, Weikert C, et al: Effect of endotoxin, dobutamine and dopamine on muscle mitochondrial respiration in vitro. *J Endotoxin Res* 2006; 12:358–366
- Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, et al: Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J* 1999; 13:1637–1646
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE: Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001; 495:12–15
- Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, et al: Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286:R491–R497
- Chuang YC, Tsai JL, Chang AY, et al: Dysfunction of the mitochondrial respiratory chain in the rostral ventrolateral medulla

- during experimental endotoxemia in the rat. *J Biomed Sci* 2002; 9:542–548
38. Vanhorebeek I, De Vos R, Mesotten D, et al: Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *Lancet* 2005; 365:53–59
 39. Fink MP: Cytopathic hypoxia: Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin* 2001; 17:219–237
 40. Moncada S, Bolanos JP: Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem* 2006; 97:1676–1689
 41. D'Amico G, Lam F, Hagen T, et al: Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *J Cell Sci* 2006; 119: 2291–2298
 42. Riobo NA, Clementi E, Melani M, et al: Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J* 2001; 359: 139–145
 43. Clementi E, Brown GC, Feelisch M, et al: Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective ac-
tion of glutathione. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1998; 95:7631–7636
 44. Barker JE, Heales SJ, Cassidy A, et al: Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity, an enzyme susceptible to oxidative damage. *Brain Res* 1996; 716:118–122
 45. Bolanos JP, Heales SJ, Peuchen S, et al: Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: A potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:995–1001
 46. Gegg ME, Beltran B, Salas-Pino S, et al: Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: Implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem* 2003; 86:228–237
 47. Kadoi Y, Goto F: Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats. *Anesth Analg* 2004; 99:212–220
 48. Callahan LA, Supinski GS: Sepsis induces diaphragm electron transport chain dysfunction and protein depletion. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:861–868
 49. Letellier T, Heinrich R, Malgat M, et al: The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: A systemic approach. *Biochem J* 1994; 302(Pt 1):171–174
 50. Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, et al: Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome *c* oxidase. *J Exp Biol* 1998; 201: 1129–1139
 51. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, et al: Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002; 415:96–99
 52. Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, et al: A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J* 2003; 22:4103–4110
 53. Sun X, Wray C, Tian X, et al: Expression of uncoupling protein 3 is upregulated in skeletal muscle during sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E512–E520
 54. Boveris A, Chance B: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134:707–716
 55. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA: High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 416: 15–18

5. DISCUSSÃO

A inflamação induz alterações metabólicas e bioenergéticas em diversos tipos celulares, especialmente células do sistema imunológico (FINK, 2000; CROUSER, 2004; NIZET & JOHNSON, 2009). Disfunções mitocondriais, tanto bioquímicas quanto estruturais, têm sido associadas à fisiopatologia da sepse (EXLINE & CROUSER, 2008). Neste sentido, os dados apresentados nesta tese demonstram que a sepse induz disfunções mitocondriais por diferentes mecanismos dependendo do tipo celular e da natureza do insulto inflamatório.

O efeito desacoplador do LPS

O perfil de consumo de oxigênio dos macrófagos é precocemente alterado na presença de LPS (Figura 9). Os macrófagos ativados com LPS *in vitro* apresentaram aumento da respiração não associada à síntese de ATP (estado 4) caracterizando um desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial (Figuras 8 e 9). Este fenômeno foi confirmado por medidas da emissão de fluorescência do JC1, que é considerada um indicador do potencial de membrana mitocondrial. Este experimento mostrou que o LPS tem efeito de diminuir o potencial de membrana mitocondrial dos macrófagos em níveis comparáveis ao efeito do FCCP, um agente desacoplador (Figura 10). Ao longo do tempo de incubação com LPS observamos uma progressiva perda de controle respiratório (Figura 9). Estes resultados indicam um aumento da permeabilidade da membrana interna mitocondrial (MIM) dos macrófagos ativados com LPS (Resultados Parte I).

Condizente com os nossos achados de que o LPS tem efeito desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, um estudo *in vivo* em um modelo de endotoxemia sugeriu que o LPS teria um efeito desacoplador precoce em tecidos bastante afetados como o intestino

dos ratos durante a sepse (SCHAEFER e cols., 1991). Em um estudo seguinte, os autores também mostraram o efeito desacoplador do LPS no cérebro dos ratos utilizando o mesmo modelo de endotoxemia (SCHAEFER & BIBER, 1993). Foi observada uma rápida diminuição do conteúdo de oxihemoglobina cerebral (10 min. após a injeção de LPS) concomitante a um aumento dos níveis de deoxihemoglobina e aumento do conteúdo de citocromos a,a₃ reduzidos, o que reflete uma diminuição do consumo de oxigênio pela citocromo c oxidase em paralelo a um aumento da taxa de extração de oxigênio cerebral neste modelo. Os autores concluíram que o cérebro aumenta a extração de oxigênio para compensar a diminuição no fluxo sanguíneo e que a hiperlactatemia não pode ser explicada pela diminuição na concentração de oxigênio tecidual (SCHAEFER & BIBER, 1993).

Outros estudos já observaram desacoplamento e perda de potencial de membrana mitocondrial em monócitos de pacientes sépticos (ADRIE e cols., 2001; BELIKOVA e cols., 2007). Um estudo recente mostrou que fatores presentes no plasma de pacientes sépticos induzem o desacoplamento mitocondrial de monócitos periféricos (PBMC) *in vitro* (BELIKOVA e cols., 2007), o que está de acordo com os nossos achados nos estudos com macrófagos estimulados com LPS *in vitro* onde obtivemos resultados semelhantes (Resultados Parte I). O nosso estudo com PBMC isolados de pacientes sépticos, entretanto, revelou uma diminuição do consumo de oxigênio no estado 3 comparado a PBMC de indivíduos não-sépticos; este comprometimento da função mitocondrial não envolve a redução do fluxo de elétrons pela CTE e nem o transporte de succinato através da MIM (Resultados Parte II, Figura 2) porque o aumento da respiração mitocondrial desacoplada foi similar entre os grupos (Resultados Parte II, Figura 1B).

Possíveis mecanismos responsáveis pela disfunção mitocondrial

O TNF- α circulante pode ser um dos mecanismos responsáveis pelas alterações da função mitocondrial dos PBMC que observamos em pacientes com choque séptico (Resultados Parte II). Pelo menos dois estudos já documentaram o efeito deletério do TNF- α sobre a CTE e a ultra-estrutura mitocondrial (SCHULZE-OSTHOFF e cols., 1992; SAMAVATI e cols., 2008). Um dos estudos realizado em hepatócitos mostrou que a sinalização intracelular disparada pelo TNF- α leva a fosforilação específica da citocromo c oxidase (CcO) diminuindo sua atividade. Os autores também observaram que o TNF- α gera uma rápida perda de potencial de membrana mitocondrial e atribuíram este efeito a diminuição da atividade CcO e conseqüente menor bombeamento de prótons para a formação do potencial de membrana (SAMAVATI e cols., 2008).

A endotoxemia leva a uma diminuição na expressão dos componentes da CTE mitocondrial de monócitos humanos (CALVANO e cols., 2005). Este estudo revelou que durante a inflamação sistêmica induzida por LPS há diminuição da expressão dos complexos I-IV e da ATP sintase, bem como o complexo piruvato desidrogenase necessário para a geração de equivalentes reduzidos que alimentam a fosforilação oxidativa (CALVANO e cols., 2005). O balanço energético celular, ou seja, as razões ADP/ ATP e NAD/ NADH, podem regular a expressão gênica através de moléculas como a proteína cinase ativada por AMP (AMPK) e fatores de transcrição como a *carboxyl-terminal binding protein* (CtBP), um corepressor que regula a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento, ao ciclo celular, entre outros, que é regulado por NADH (ZHANG e cols., 2002). Estes mecanismos funcionam como sensores do nível energético celular regulando o metabolismo (RAMAMURTHY & RONNETT, 2006; LAGE e cols., 2008).

Nossos resultados e estudos da literatura mostram que a sepse está associada com o mau funcionamento da respiração mitocondrial (CROUSER, 2004; ABRAHAM & SINGER, 2007). Uma das principais características da sepse é um aumento da produção de lactato que pode ser detectado na corrente sanguínea e é atribuído ao metabolismo anaeróbico, como consequência da hipoperfusão tecidual (HART e cols., 2003). Há um aumento na captação de glicose durante a sepse (HAJI-MICHAEL e cols., 1999) que aparentemente é maior nos tecidos ricos em macrófagos (LANG & DOBRESU, 1991), indicando que estas células se tornam extremamente glicolíticas durante a inflamação.

Evidências na literatura levam a crer que a ativação da enzima poli-ADP-ribose polimerase (PARP) durante a inflamação seria o principal indutor da conversão de piruvato a lactato para regenerar os níveis de NAD diminuídos durante a sepse. O aumento da captação de glicose e a produção aumentada de NAD pela lactato desidrogenase, ambos fenômenos observados durante a sepse, garantem o funcionamento da via glicolítica e a produção de ATP na ausência da fosforilação oxidativa. A ativação de PARP é considerada um dos principais mecanismos de falência energética na sepse (FINK, 2002; SORIANO e cols., 2002). PARP-1 é uma enzima nuclear abundante que é ativada quando há dano ao DNA. A ativação de PARP-1 consome NAD para formar polímeros de (poli)ADP-ribose. A ativação excessiva de PARP, entretanto, pode diminuir dramaticamente os níveis de NAD citoplasmático, diminuindo a velocidade da via glicolítica, o transporte de elétrons e a formação de ATP. Este processo pode resultar em disfunção e morte celular (SZABO, 2007). Um estudo realizado em astrócitos mostrou que a ativação de PARP-1 leva a uma rápida depleção dos níveis de NAD citosólico mas não altera o *pool* de NAD mitocondrial. A depleção de NAD citosólico torna as células incapazes de utilizar glicose como substrato metabólico (YING e cols., 2005). Outro estudo mostrou que a depleção de NAD e o aumento da permeabilidade do poro de transição mitocondrial são eventos necessários para a morte celular mediada por PARP-1 (ALANO e

cols., 2004). Quando os níveis de NAD eram restaurados havia recuperação do potencial de membrana mitocondrial e sobrevivência celular. Os autores ainda observaram que tanto o NAD quanto a ciclosporina A, substrato para a via glicolítica e inibidor da transição de permeabilidade mitocondrial, respectivamente, bloqueavam a translocação de fatores apoptóticos mitocondriais para o núcleo, fenômeno necessário para a via de morte celular induzida por PARP-1 (ALANO e cols., 2004). A ativação excessiva de PARP-1 por dano ao DNA durante a isquemia, por exemplo, é uma das principais causas de morte celular independente de caspases durante o processo inflamatório. Estudos pré-clínicos em diversos modelos de roedores e outros mamíferos demonstraram que a inibição de PARP exerce efeitos benéficos nas alterações metabólicas e hemodinâmicas associadas com a sepse e o choque hemorrágico (SZABO, 2007).

A sepse afeta a função mitocondrial no sistema nervoso central

A outra pergunta que procuramos responder está relacionada ao efeito da inflamação sistêmica na função mitocondrial do tecido cerebral e suas possíveis implicações no desenvolvimento da encefalopatia associada à sepse (EAS). Acredita-se que a quebra da barreira hemato-encefálica (BHE) seja um dos potenciais mecanismos de desenvolvimento da EAS. Já foi mostrado que o TNF- α tem efeitos diretos sobre a permeabilidade da BHE em um modelo *in vitro* (ANDA, e cols., 1997). As células endoteliais do cérebro, uma vez ativadas, expressam fatores como CD40, moléculas de adesão vascular e intracelular, E-selectina, ciclooxigenases, iNOS e citocinas, que contribuem para a ativação das células ao seu redor ao serem ativadas por LPS (SIAMI e cols., 2008). Assim como nos órgãos sistêmicos, a cascata inflamatória cerebral é altamente dependente da transdução de sinal via NF- κ B. Esta resposta

está associada a uma profunda ativação da transcrição de genes da resposta imune pela microglia (KALTSCHMIDT e cols., 1994).

O aumento da permeabilidade da BHE já foi demonstrado em diferentes modelos de sepse experimental (CLAWSON e cols., 1966; PAPADOPOULOS e cols., 1999; BOZZA e cols., 2009). Em um modelo de CLP em porcos foi observada a indução de edema perimicrovascular, inchamento dos astrócitos e desligamento dos seus prolongamentos que circundam a microvasculatura cerebral (PAPADOPOULOS e cols., 1999). O mesmo fenômeno já foi descrito no hipocampo de ratos sépticos (KAFKA e cols., 2007). O edema perimicrovascular prejudica o transporte de oxigênio, de nutriente e de metabólitos, enquanto o aumento da permeabilidade da BHE facilita a passagem de vários fatores neurotóxicos. Além disso, a ativação do endotélio leva também a disfunção circulatória, com alteração do tônus vascular e da coagulação contribuindo assim para o desenvolvimento de episódios de isquemia e hemorragia. Bozza e colaboradores (2009) mostraram a formação de edema na base do cérebro de animais sépticos através de um estudo de imagem por ressonância magnética (RM) e espectroscopia. O edema foi observado 6h e 24h após o CLP, demonstrando a quebra da BHE nos animais sépticos. Os autores concluíram que tanto edema vasogênico quanto citotóxico parecem estar presentes neste modelo (BOZZA e cols., 2009). Em contraste, em outro estudo que utilizou o modelo de endotoxemia não foi observada a formação de edema cerebral utilizando as técnicas de RM (ROSENGARTEN e cols., 2008).

Sabe-se que os níveis de NO estão aumentados durante a sepse e que o NO é uma das moléculas responsáveis pela disfunção cardiovascular observada nos pacientes sépticos (FERNANDES & ASSREUY, 2008). Alguns estudos levam a crer que o dano associado à sepse é derivado da falência bioenergética induzida por altas concentrações de NO. As espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio são amplamente produzidas durante a sepse e atuam tanto como substâncias vasoativas, responsáveis pela hiporeatividade vascular, quanto

como inibidores da função mitocondrial (PODEROSO e cols., 1996; CASSINA & RADI, 1996). Os complexos da CTE mitocondrial podem ser inibidos pelo NO e suas espécies correlatas como o peroxinitrito, o que também pode contribuir para a deficiência no metabolismo energético observada durante a sepse (CASSINA & RADI, 1996). Os níveis aumentados de NO produzido por macrófagos ativados durante a sepse seriam suficientes para inibir a CcO e a respiração mitocondrial em células vizinhas, podendo comprometer a produção de ATP em diversos órgãos (BROWN e cols., 1998). Por outro lado o NO já foi descrito como uma molécula sinalizadora no sistema nervoso central. Almeida e colaboradores mostraram que o NO funciona como uma molécula reguladora do metabolismo energético através da via de sinalização do AMPK (ALMEIDA e cols., 2004). Outros estudos sugerem que o NO pode ser um neurotransmissor em concentrações abaixo dos níveis tóxicos (SNYDER e cols., 1998). Assim, o NO parece ter um papel dúbio no sistema nervoso central, sendo neuroprotetor em concentrações fisiológicas e claramente neurotóxico em altas concentrações (CALABRESE e cols., 2007).

No estudo que realizamos com preparações frescas de cérebro de camundongos bem como mitocôndrias isoladas deste tecido, observamos desacoplamento mitocondrial induzido pela sepse (Resultados PARTE III). As mitocôndrias isoladas do tecido cerebral de animais após 24h de sepse apresentaram maior permeabilidade da membrana interna mitocondrial e os ensaios de respiração demonstraram um aumento do consumo de oxigênio não associado à síntese de ATP (estado 4). Além disso, também observamos uma redução no conteúdo de citocromos no cérebro dos camundongos sépticos. A redução do conteúdo total de mitocôndrias já foi documentada em um modelo de CLP; os autores postulam que o aumento da autofagia seria um dos mecanismos de degradação mitocondrial (WATTS e cols., 2004). O aumento do consumo de oxigênio tecidual já foi demonstrado em um modelo de choque séptico em suínos (HART e cols., 2003).

O desacoplamento mitocondrial está associado a uma série de fenômenos fisiológicos e patológicos. As alterações do potencial de membrana mitocondrial estão associadas a uma série de eventos, desde a sinalização de apoptose até a regulação do metabolismo energético neuronal (MATTIASSON e cols., 2003; LIU e cols., 2006). A UCP-2 é induzida na inflamação e parece estar associada ao controle do potencial de membrana e geração de ROS mitocondrial (MATTIASSON & SULLIVAN, 2006). Outro estudo sobre a função da UCP-4 em neurônios observou que o silenciamento da UCP-4 neuronal por RNA de interferência levou ao acúmulo de cálcio pelas mitocôndrias e morte celular. O aumento da expressão da UCP-4 gerou desacoplamento da CTE mitocondrial e sobrevivência neuronal. Os autores postulam que a expressão de UCP-4 faz parte do mecanismo de sinalização metabólica de desligamento do metabolismo aeróbico mitocondrial e concomitante indução da via glicolítica de geração de ATP. O desacoplamento induzido pela UCP-4 protege os neurônios da morte celular por estresse oxidativo e sobrecarga de cálcio, através da regulação do metabolismo energético que deixa de ser aeróbico e mitocondrial passando a ser mais glicolítico (LIU e cols., 2006).

O potencial de membrana mitocondrial é necessário para a síntese de ATP. Estudos realizados *in vivo* em modelos de sepse (CROUSER e cols., 2002) e outras doenças neuro-inflamatórias (OKONKWO & POVLISHOCK, 1999) mostram o efeito protetor da ciclosporina A através da manutenção do potencial de membrana mitocondrial. Durante a inflamação a preservação do potencial de membrana com ciclosporina A foi benéfica para a função do miocárdio e prevenção de apoptose, como mostrou um estudo realizado com modelo de endotoxemia em ratos (HAROLD e cols., 2002). Outro estudo também mostrou um efeito protetor da inibição da transição de permeabilidade mitocondrial na prevenção da disfunção do miocárdio e mortalidade (LARCHE e cols., 2006). Estes estudos mostram que a

disfunção mitocondrial na sepse é um fator causal e relevante em termos de preservação de órgãos vitais.

Assim como a inflamação periférica, a neuroinflamação também altera o microambiente do tecido cerebral com a produção de espécies oxidantes e diversos mediadores inflamatórios (BARICHELLO e cols., 2006). O cérebro é um órgão particularmente sensível ao estresse oxidativo (SANTIAGO e cols., 2008) necessitando de defesas antioxidantes especiais, como a enzima hexoquinase ligada a membrana externa mitocondrial que funciona como um mecanismo antioxidante preventivo através da ciclagem de ADP e manutenção da geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria (DA SILVA e cols., 2004). Marcadores bioquímicos de dano oxidativo já foram detectados no cérebro de camundongos sépticos, podendo ser um dos fatores responsáveis pelo declínio cognitivo observado nos animais sobreviventes (BARICHELLO e cols., 2005, 2006). Alguns estudos sugerem que o uso de antioxidantes pode ser benéfico na sepse (BAYIR & KAGAN, 2008; ESCAMES e cols., 2003; NIN e cols., 2004; ZAPELINI e cols., 2008).

No nosso modelo não detectamos estresse oxidativo de origem mitocondrial 24h após a CLP. As mitocôndrias isoladas do cérebro dos camundongos sépticos apresentaram um aumento da permeabilidade da membrana interna com perda de potencial de membrana e diminuição da produção *in vitro* de H₂O₂. Entretanto é possível que a produção de espécies reativas pela mitocôndria aconteça mais precocemente e não tenha sido detectada nas nossas condições experimentais. Outra possibilidade é que o estresse oxidativo tenha origem não-mitocondrial. Recentemente um estudo mostrou que a NADPH oxidase neuronal, e não a mitocôndria, é a responsável pelo estresse oxidativo proveniente da ativação dos receptores de glutamato do tipo NMDA durante a excitotoxicidade (BRENNAN *et al.*, 2009). A NADPH oxidase é um complexo enzimático especializado na produção de superóxido que utiliza oxigênio em sua reação catalítica, transferindo elétrons da molécula de NADPH para o

oxigênio formando superóxido; sua atividade é dependente de glicose e da via das pentoses de geração de NADPH (KUMMER e cols, 1995). Assim, a mitocôndria pode não ser a principal fonte de ROS nos neurônios durante a inflamação cerebral.

A Hipóxia Citopática na Seps

Nos últimos 20 anos o entendimento da patogênese da seps evoluiu consideravelmente. A resposta inflamatória exacerbada já foi alvo de inúmeros estudos clínicos que surpreendentemente não tiveram muito sucesso. Uma das poucas terapias farmacológicas que demonstraram efeito sobre a mortalidade foi a proteína C ativada (DHAINAUT, 2004). Mesmo assim a mortalidade da seps continua alta e a geração de terapias mais eficazes é urgente.

A falência bioenergética vem sendo cada vez mais considerada um importante aspecto da fisiopatologia da seps. Os resultados de uma série de estudos parece confirmar que de fato existe um comprometimento da função mitocondrial durante a seps (SINGER, 2007; LEVERVE, 2007; LEVY & DEUTSCHMAN, 2007; BREALEY e cols., 2002) e que a SDOM é resultado da produção de espécies oxidantes induzida por citocinas e alterações hormonais (CROUSER, 2004; CARRÉ & SINGER, 2008). Entretanto, outras evidências demonstram uma rápida recuperação da função orgânica e ausência de sinais de morte celular expressiva nos órgãos afetados, o que levou um grupo de cientistas a propor uma hipótese alternativa para explicar a falência orgânica observada na seps: a teoria da hipóxia citopática (FINK, 2000). Esta teoria tenta explicar os mecanismos pelos quais, durante a inflamação ou seps, há uma diminuição da capacidade de utilização de oxigênio pelos tecidos, mesmo quando a disponibilidade de oxigênio não é limitada. A diminuição do metabolismo durante a

inflamação seria um mecanismo de adaptação à fase aguda da doença para sobreviver à escassez de nutriente e ATP.

De fato as células do sistema imune, responsáveis por defender o organismo durante a doença, precisam se adaptar de forma eficiente a diferentes microambientes. Assim como alguns tipos de patógenos e células tumorais, as células do sistema imune inato (macrófagos e neutrófilos) são conhecidas por sua capacidade de adaptação à hipóxia; faz parte de sua atividade a migração para microambientes adversos com baixas concentrações de oxigênio e nutrientes, acidose e altos níveis de substâncias citotóxicas, como o sítio inflamatório durante um trauma ou infecção. A mudança da fosforilação oxidativa mitocondrial para a via glicolítica de geração de ATP representa uma das principais adaptações destas células ao microambiente pró-inflamatório (NIZET & JOHNSON, 2009). As disfunções mitocondriais observadas nesta tese, tanto nas células do sistema imune (Resultados Partes I e II) quanto no cérebro dos camundongos sépticos (Resultados Parte III), sustentam a teoria da hipóxia citopática, abrindo novas perspectivas para tratamento da sepse.

Neste sentido, diversos estudos já observaram os efeitos benéficos de substratos do metabolismo energético em diferentes modelos experimentais de sepse. O tratamento com nicotinamida no modelo de choque endotóxico evitou a falência vascular (ZINGARELLI e cols, 1996). Em outro modelo de sepse a administração de succinato recuperou o consumo de oxigênio que estava comprometido no músculo esquelético dos animais sépticos (PROTTI e cols., 2007). A administração periférica de outro substrato do metabolismo energético, o piruvato, já mostrou efeitos benéficos em diversos modelos de doenças, incluindo isquemia (WANG e cols., 2009), hipoglicemia (SUH e cols, 2005), sepse e choque hemorrágico (FINK, 2004).

Intervenções terapêuticas que tenham um efeito sobre o metabolismo energético também são de especial interesse no contexto da sepse. A norepinefrina é normalmente

administrada aos pacientes e seu efeito sobre a respiração mitocondrial é particularmente importante na fase hipodinâmica da sepse. Em um modelo de endotoxemia em porcos, observou-se o efeito da norepinefrina no aumento da respiração mitocondrial de hepatócitos (REGUEIRA e cols., 2008). Outro estudo observou que o tratamento de pacientes em terapia intensiva com antioxidantes não foi capaz de reduzir a disfunção orgânica mas teve efeito significativo em pacientes com injúrias inflamatórias muito intensas, como trauma ou cirurgia cardíaca (BERGER e cols., 2008).

Assim, podemos considerar que as disfunções mitocondriais fazem parte da fisiopatologia da sepse. Tendo em vista o conhecimento acumulado ao longo de mais de um século de estudos sobre as vias metabólicas, é interessante pensar que a suplementação com substratos do metabolismo energético pode funcionar como uma terapia potencialmente segura e eficaz para o tratamento de doenças inflamatórias como a sepse.

6. CONCLUSÕES

- O LPS induz precocemente o desacoplamento da fosforilação oxidativa nos macrófagos
- Os monócitos circulantes de pacientes sépticos apresentam uma diminuição da respiração celular associada à síntese de ATP.
- A sepse experimental induzida por CLP causa uma série de disfunções mitocondriais no tecido cerebral dos camundongos: desacoplamento da fosforilação oxidativa, aumento da permeabilidade da membrana interna mitocondrial à prótons, diminuição do conteúdo de citocromos mitocondriais, diminuição da atividade da citocromo c oxidase e diminuição da capacidade de sintetizar ATP.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med* [S.I.], v. 35, n. 10, p. 2408-16, Oct 2007.
- ADRIE, C. et al. Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* [S.I.], v. 164, n. 3, p. 389-95, Aug 1 2001.
- ALANO, C. C. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* [S.I.], v. 279, n. 18, p. 18895-902, Apr 30 2004.
- ALMEIDA, A. et al. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* [S.I.], v. 6, n. 1, p. 45-51, Jan 2004.
- ANDA, T. et al. Effect of tumor necrosis factor-alpha on the permeability of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *Neurol Res* [S.I.], v. 19, n. 4, p. 369-76, Aug 1997.
- ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* [S.I.], v. 29, n. 7 Suppl, p. S109-16, Jul 2001.
- ATAMNA, H. Heme, iron, and the mitochondrial decay of ageing. *Ageing Res Rev* [S.I.], v. 3, n. 3, p. 303-18, Jul 2004.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. *Blood* [S.I.], v. 93, n. 5, p. 1464-76, Mar 1 1999.
- BABIOR, B. M. et al. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* [S.I.], v. 52, n. 3, p. 741-4, Mar 1973.
- BAL-PRICE, A.; BROWN, G. C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci* [S.I.], v. 21, n. 17, p. 6480-91, Sep 1 2001.
- BARICHELLO, T. et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med* [S.I.], v. 34, n. 3, p. 886-9, Mar 2006.
- _____. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit Care Med* [S.I.], v. 35, n. 9, p. 2186-90, Sep 2007.
- _____. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med* [S.I.], v. 33, n. 1, p. 221-3; discussion 262-3, Jan 2005.

- BAYIR, H.; KAGAN, V. E. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care [S.I.]*, v. 12, n. 1, p. 206, 2008.
- BERGER, M. M. et al. Influence of early antioxidant supplements on clinical evolution and organ function in critically ill cardiac surgery, major trauma, and subarachnoid hemorrhage patients. *Crit Care [S.I.]*, v. 12, n. 4, p. R101, 2008.
- BLACKSTONE, E. et al. H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science [S.I.]*, v. 308, n. 5721, p. 518, Apr 22 2005.
- BOCZKOWSKI, J. et al. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J [S.I.]*, v. 13, n. 12, p. 1637-46, Sep 1999.
- BOEKSTEGERS, P. et al. Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: comparison to limited infection and cardiogenic shock. *Infection [S.I.]*, v. 19, n. 5, p. 317-23, Sep-Oct 1991.
- BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest [S.I.]*, v. 101, n. 6, p. 1644-55, Jun 1992.
- BORUTAITE, V. et al. Reversible inhibition of cellular respiration by nitric oxide in vascular inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol [S.I.]*, v. 281, n. 6, p. H2256-60, Dec 2001.
- BOVERIS, A. et al. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med [S.I.]*, v. 33, n. 9, p. 1186-93, Nov 1 2002.
- _____. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J [S.I.]*, v. 156, n. 2, p. 435-44, May 15 1976.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J [S.I.]*, v. 134, n. 3, p. 707-16, Jul 1973.
- BOVERIS, A. et al. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J [S.I.]*, v. 128, n. 3, p. 617-30, Jul 1972.
- BOYER, P. D. A research journey with ATP synthase. *J Biol Chem [S.I.]*, v. 277, n. 42, p. 39045-61, Oct 18 2002.
- BOZZA, F. A. et al. Sepsis-associated encephalopathy: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. *J Cereb Blood Flow Metab [S.I.]*, Oct 21 2009.

- _____. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care [S.I.]*, v. 11, n. 2, p. R49, 2007.
- BRAND, M. D. et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med [S.I.]*, v. 37, n. 6, p. 755-67, Sep 15 2004.
- _____. The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int J Obes Relat Metab Disord [S.I.]*, v. 23 Suppl 6, p. S4-11, Jun 1999.
- BREALEY, D. et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet [S.I.]*, v. 360, n. 9328, p. 219-23, Jul 20 2002.
- _____. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet [S.I.]*, v. 360, n. 9328, p. 219-23, Jul 20 2002.
- _____. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol [S.I.]*, v. 286, n. 3, p. R491-7, Mar 2004.
- BRENNAN, A. M. et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci [S.I.]*, v. 12, n. 7, p. 857-63, Jul 2009.
- BRODER, G.; WEIL, M. H. Excess Lactate: An Index of Reversibility of Shock in Human Patients. *Science [S.I.]*, v. 143, p. 1457-9, Mar 27 1964.
- BROWN, G. C. et al. Transcellular regulation of cell respiration by nitric oxide generated by activated macrophages. *FEBS Lett [S.I.]*, v. 439, n. 3, p. 321-4, Nov 20 1998.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature [S.I.]*, v. 414, n. 6865, p. 813-20, Dec 13 2001.
- BURAS, J. A. et al. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov [S.I.]*, v. 4, n. 10, p. 854-65, Oct 2005.
- CADENAS, E. et al. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys [S.I.]*, v. 180, n. 2, p. 248-57, Apr 30 1977.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med [S.I.]*, v. 29, n. 3-4, p. 222-30, Aug 2000.
- CALABRESE, V. et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci [S.I.]*, v. 8, n. 10, p. 766-75, Oct 2007.
- CALLAHAN, L. A.; SUPINSKI, G. S. Downregulation of diaphragm electron transport chain and glycolytic enzyme gene expression in sepsis. *J Appl Physiol [S.I.]*, v. 99, n. 3, p. 1120-6, Sep 2005.

- CALVANO, S. E. et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* [S.I.], v. 437, n. 7061, p. 1032-7, Oct 13 2005.
- CARLSON, D. E. et al. Hypotensive hemorrhage increases calcium uptake capacity and Bcl-XL content of liver mitochondria. *Shock* [S.I.], v. 27, n. 2, p. 192-8, Feb 2007.
- CARRE, J. E.; SINGER, M. Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1777, n. 7-8, p. 763-71, Jul-Aug 2008.
- CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 328, n. 2, p. 309-16, Apr 15 1996.
- CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* [S.I.], v. 217, n. 1, p. 409-27, Nov 1955.
- CHEN, H. W. et al. Heat shock pretreatment prevents cardiac mitochondrial dysfunction during sepsis. *Shock* [S.I.], v. 20, n. 3, p. 274-9, Sep 2003.
- CHIOLERO, R. et al. Energy metabolism in sepsis and injury. *Nutrition* [S.I.], v. 13, n. 9 Suppl, p. 45S-51S, Sep 1997.
- CHUANG, Y. C. et al. Dysfunction of the mitochondrial respiratory chain in the rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. *J Biomed Sci* [S.I.], v. 9, n. 6 Pt 1, p. 542-8, 2002.
- CLAWSON, C. C. et al. Electron microscopy of the effect of gram-negative endotoxin on the blood-brain barrier. *J Comp Neurol* [S.I.], v. 127, n. 2, p. 183-98, Jun 1966.
- CLEETER, M. W. et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* [S.I.], v. 345, n. 1, p. 50-4, May 23 1994.
- COMIM, C. M. et al. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion* [S.I.], v. 8, n. 4, p. 313-8, Sep 2008.
- CROUSER, E. D. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion* [S.I.], v. 4, n. 5-6, p. 729-41, Sep 2004.
- CROUSER, E. D. et al. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit Care Med* [S.I.], v. 30, n. 2, p. 276-84, Feb 2002.

- _____. Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. *Crit Care Med* [S.I.], v. 32, n. 2, p. 478-88, Feb 2004.
- CUNNINGHAM, E. T., JR. et al. In situ histochemical localization of type I interleukin-1 receptor messenger RNA in the central nervous system, pituitary, and adrenal gland of the mouse. *J Neurosci* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 1101-14, Mar 1992.
- DAL-PIZZOL, F. et al. Oxidative Mechanisms of Brain Dysfunction During Sepsis. *Neurochem Res* [S.I.], Aug 14 2009.
- DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 46-56, Jan 2008.
- DA-SILVA, W. S. et al. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J Biol Chem* [S.I.], v. 279, n. 38, p. 39846-55, Sep 17 2004.
- DAVID-NETO, E. et al. C4d-positive chronic rejection: a frequent entity with a poor outcome. *Transplantation* [S.I.], v. 84, n. 11, p. 1391-8, Dec 15 2007.
- DEITCH, E. A. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* [S.I.], v. 24 Suppl 1, p. 19-23, Dec 2005.
- DHAINAUT, J. F. et al. Protein C/activated protein C pathway: overview of clinical trial results in severe sepsis. *Crit Care Med* [S.I.], v. 32, n. 5 Suppl, p. S194-201, May 2004.
- DIXON, B. The role of microvascular thrombosis in sepsis. *Anaesth Intensive Care* [S.I.], v. 32, n. 5, p. 619-29, Oct 2004.
- ESCAMES, G. et al. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol* [S.I.], v. 41, n. 11, p. 1165-73, Nov 2006.
- EXLINE, M. C.; CROUSER, E. D. Mitochondrial mechanisms of sepsis-induced organ failure. *Front Biosci* [S.I.], v. 13, p. 5030-41, 2008.
- FAUVEL, H. et al. Protective effects of cyclosporin A from endotoxin-induced myocardial dysfunction and apoptosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med* [S.I.], v. 165, n. 4, p. 449-55, Feb 15 2002.
- FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* [S.I.], v. 272, n. 5258, p. 50-3, Apr 5 1996.

- FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock* [S.I.], v. 30 Suppl 1, p. 10-3, Oct 2008.
- FINK, M. P. Cytopathic hypoxia. A concept to explain organ dysfunction in sepsis. *Minerva Anesthesiol* [S.I.], v. 66, n. 5, p. 337-42, May 2000.
- _____. Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin* [S.I.], v. 17, n. 1, p. 219-37, Jan 2001.
- _____. Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis and shock. *Minerva Anesthesiol* [S.I.], v. 70, n. 5, p. 365-71, May 2004.
- FINK, M. P.; EVANS, T. W. Mechanisms of organ dysfunction in critical illness: report from a Round Table Conference held in Brussels. *Intensive Care Med* [S.I.], v. 28, n. 3, p. 369-75, Mar 2002.
- FREUND, H. et al. Plasma amino acids as predictors of the severity and outcome of sepsis. *Ann Surg* [S.I.], v. 190, n. 5, p. 571-6, Nov 1979.
- FREUND, H. R. et al. Brain neurotransmitter profile is deranged during sepsis and septic encephalopathy in the rat. *J Surg Res* [S.I.], v. 38, n. 3, p. 267-71, Mar 1985.
- FRIBERG, H.; WIELOCH, T. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochimie* [S.I.], v. 84, n. 2-3, p. 241-50, Feb-Mar 2002.
- FUKUMOTO, K. et al. Differential effects of neonatal endotoxemia on heart and kidney carnitine palmitoyl transferase I. *J Pediatr Surg* [S.I.], v. 37, n. 5, p. 723-6, May 2002.
- GELLERICH, F. N. et al. Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of Complex I and Complex II of the mitochondrial respiratory chain. *Shock* [S.I.], v. 11, n. 5, p. 336-41, May 1999.
- GOGVADZE, V. et al. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1757, n. 5-6, p. 639-47, May-Jun 2006.
- GOMEZ-JIMENEZ, J. et al. L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit Care Med* [S.I.], v. 23, n. 2, p. 253-8, Feb 1995.
- GREER, G. G.; MILAZZO, F. H. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: an uncoupler of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Can J Microbiol* [S.I.], v. 21, n. 6, p. 877-83, Jun 1975.
- GRIENDLING, K. K. et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [S.I.], v. 20, n. 10, p. 2175-83, Oct 2000.

- HACK, C. E. Tissue factor pathway of coagulation in sepsis. *Crit Care Med* [S.I.], v. 28, n. 9 Suppl, p. S25-30, Sep 2000.
- HAJI-MICHAEL, P. G. et al. Leukocyte glycolysis and lactate output in animal sepsis and ex vivo human blood. *Metabolism* [S.I.], v. 48, n. 6, p. 779-85, Jun 1999.
- HANISCH, U.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neurosci*, v. 10, n. 11, p. 1387-94, Nov 2007.
- HART, D. W. et al. Increased tissue oxygen extraction and acidosis with progressive severity of sepsis. *J Surg Res* [S.I.], v. 112, n. 1, p. 49-58, Jun 1 2003.
- HAYES, M. A. et al. Elevation of systemic oxygen delivery in the treatment of critically ill patients. *N Engl J Med* [S.I.], v. 330, n. 24, p. 1717-22, Jun 16 1994.
- HOPKINS, R. O.; JACKSON, J. C. Long-term neurocognitive function after critical illness. *Chest* [S.I.], v. 130, n. 3, p. 869-78, Sep 2006.
- HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* [S.I.], v. 348, n. 2, p. 138-50, Jan 9 2003.
- HOTCHKISS, R. S. et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* [S.I.], v. 27, n. 7, p. 1230-51, Jul 1999.
- IDELL, S. Extravascular coagulation and fibrin deposition in acute lung injury. *New Horiz* [S.I.], v. 2, n. 4, p. 566-74, Nov 1994.
- JEPSSON, B. et al. Blood-brain barrier derangement in sepsis: cause of septic encephalopathy? *Am J Surg* [S.I.], v. 141, n. 1, p. 136-42, Jan 1981.
- JONES, S. A. et al. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* [S.I.], v. 271, n. 4 Pt 2, p. H1626-34, Oct 1996.
- KADOI, Y. et al. Impairment of the brain beta-adrenergic system during experimental endotoxemia. *J Surg Res* [S.I.], v. 61, n. 2, p. 496-502, Mar 1996.
- KAFA, I. M. et al. The peri-microvascular edema in hippocampal CA1 area in a rat model of sepsis. *Neuropathology* [S.I.], v. 27, n. 3, p. 213-20, Jun 2007.
- KALTSCHMIDT, C. et al. Transcription factor NF-kappa B is activated in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* [S.I.], v. 55, n. 1, p. 99-106, Nov 1994.
- KINNEY, J. M. Metabolic responses of the critically ill patient. *Crit Care Clin* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 569-85, Jul 1995.

- KONSMAN, J. P. et al. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol* [S.I.], v. 472, n. 1, p. 113-29, Apr 19 2004.
- KORSHUNOV, S. S. et al. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* [S.I.], v. 416, n. 1, p. 15-8, Oct 13 1997.
- KRAUSS, S. et al. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 6, n. 3, p. 248-61, Mar 2005.
- KREYMANN, G. et al. Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Crit Care Med* [S.I.], v. 21, n. 7, p. 1012-9, Jul 1993.
- KRISTAL, B. S. et al. The mitochondrial permeability transition as a target for neuroprotection. *J Bioenerg Biomembr* [S.I.], v. 36, n. 4, p. 309-12, Aug 2004.
- KULISZ, A. et al. Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [S.I.], v. 282, n. 6, p. L1324-9, Jun 2002.
- KUMMER, W.; ACKER, H. Immunohistochemical demonstration of four subunits of neutrophil NAD(P)H oxidase in type I cells of carotid body. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 78, n. 5, p. 1904-9, May 1995.
- KUNZE, K. Metabolic encephalopathies. *J Neurol* [S.I.], v. 249, n. 9, p. 1150-9, Sep 2002.
- LACROIX, S. et al. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol* [S.I.], v. 8, n. 4, p. 625-40, Oct 1998.
- LAFLAMME, N.; RIVEST, S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J* [S.I.], v. 15, n. 1, p. 155-163, Jan 2001.
- LAGE, R. et al. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* [S.I.], v. 14, n. 12, p. 539-49, Dec 2008.
- LANG, C. H.; DOBRESCU, C. Sepsis-induced increases in glucose uptake by macrophage-rich tissues persist during hypoglycemia. *Metabolism* [S.I.], v. 40, n. 6, p. 585-93, Jun 1991.
- LARCHE, J. et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality. *J Am Coll Cardiol* [S.I.], v. 48, n. 2, p. 377-85, Jul 18 2006.

- LEVERVE, X. M. Mitochondrial function and substrate availability. *Crit Care Med* [S.I.], v. 35, n. 9 Suppl, p. S454-60, Sep 2007.
- LEVI, M. Current understanding of disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol* [S.I.], v. 124, n. 5, p. 567-76, Mar 2004.
- LEVY, R. J.; DEUTSCHMAN, C. S. Cytochrome c oxidase dysfunction in sepsis. *Crit Care Med* [S.I.], v. 35, n. 9 Suppl, p. S468-75, Sep 2007.
- LIU, D. et al. Mitochondrial UCP4 mediates an adaptive shift in energy metabolism and increases the resistance of neurons to metabolic and oxidative stress. *Neuromolecular Med* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 389-414, 2006.
- MAEKAWA, T. et al. Cerebral circulation and metabolism in patients with septic encephalopathy. *Am J Emerg Med* [S.I.], v. 9, n. 2, p. 139-43, Mar 1991.
- MATTIASSON, G. et al. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* [S.I.], v. 9, n. 8, p. 1062-8, Aug 2003.
- MELA, L. et al. Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock. *Am J Physiol* [S.I.], v. 220, n. 2, p. 571-7, Feb 1971.
- MITCHELL, P. Protonmotive cytochrome system of mitochondria. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 341, p. 564-84, 1980.
- MONCADA, S.; ERUSALIMSKY, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 3, n. 3, p. 214-20, Mar 2002.
- MUNRO, J. M. et al. Recruitment of neutrophils in the local endotoxin response: association with de novo endothelial expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1. *Lab Invest* [S.I.], v. 64, n. 2, p. 295-9, Feb 1991.
- NADEAU, S.; RIVEST, S. Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience* [S.I.], v. 93, n. 4, p. 1449-64, 1999.
- NICHOLLS, D. G. et al. *Bioenergetics 3*. San Diego, Calif.: Academic Press, 2002. Disponível em: <<http://linux02.lib.cam.ac.uk:2048/login?url=http://www.mylibrary.com?id=103340>>.
- NIESSEN, F. et al. Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature* [S.I.], v. 452, n. 7187, p. 654-8, Apr 3 2008.

- NIN, N. et al. Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care Med* [S.I.], v. 30, n. 12, p. 2271-8, Dec 2004.
- NIZET, V.; JOHNSON, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* [S.I.], v. 9, n. 9, p. 609-17, Sep 2009.
- OKE, S. L.; TRACEY, K. J. The inflammatory reflex and the role of complementary and alternative medical therapies. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 1172, p. 172-80, Aug 2009.
- OKONKWO, D. O.; POVLISHOCK, J. T. An intrathecal bolus of cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* [S.I.], v. 19, n. 4, p. 443-51, Apr 1999.
- PAPADOPOULOS, M. C. et al. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med* [S.I.], v. 28, n. 8, p. 3019-24, Aug 2000.
- _____. Faecal peritonitis causes oedema and neuronal injury in pig cerebral cortex. *Clin Sci (Lond)* [S.I.], v. 96, n. 5, p. 461-6, May 1999.
- PARNET, P. et al. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. *J Neuroimmunol* [S.I.], v. 125, n. 1-2, p. 5-14, Apr 2002.
- PECK, G. et al. Serum-induced macrophage activation is related to the severity of septic shock. *Inflamm Res* [S.I.], v. 58, n. 2, p. 89-93, Feb 2009.
- PEKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4):427-34, Jun 2005.
- PERL, T. M. et al. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *JAMA* [S.I.], v. 274, n. 4, p. 338-45, Jul 26 1995.
- PODEROSO, J. J. et al. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 328, n. 1, p. 85-92, Apr 1 1996.
- PRESTON, F. E. et al. Intravascular coagulation and *E. coli* septicaemia. *J Clin Pathol* [S.I.], v. 26, n. 2, p. 120-5, Feb 1973.
- PROTTI, A. et al. Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. *Crit Care Med* [S.I.], v. 35, n. 9, p. 2150-5, Sep 2007.
- RAMAMURTHY, S.; RONNETT, G. V. Developing a head for energy sensing: AMP-activated protein kinase as a multifunctional metabolic sensor in the brain. *J Physiol* [S.I.], v. 574, n. Pt 1, p. 85-93, Jul 1 2006.

- REDL, H. et al. Expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 in septic but not traumatic/hypovolemic shock in the baboon. *Am J Pathol [S.I.]*, v. 139, n. 2, p. 461-6, Aug 1991.
- REERS, M. et al. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry [S.I.]*, v. 30, n. 18, p. 4480-6, May 7 1991.
- REGUEIRA, T. et al. Norepinephrine to increase blood pressure in endotoxaemic pigs is associated with improved hepatic mitochondrial respiration. *Crit Care [S.I.]*, v. 12, n. 4, p. R88, 2008.
- REMICK, D. G. et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock [S.I.]*, v. 13, n. 2, p. 110-6, Feb 2000.
- ROSENGARTEN, B. et al. LPS-induced endotoxic shock does not cause early brain edema formation - an MRI study in rats. *Inflamm Res [S.I.]*, v. 57, n. 10, p. 479-83, Oct 2008.
- ROSSI, F. The O₂⁻-forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochim Biophys Acta [S.I.]*, v. 853, n. 1, p. 65-89, Nov 4 1986.
- RUSSELL, J. A. Management of sepsis. *N Engl J Med [S.I.]*, v. 355, n. 16, p. 1699-713, Oct 19 2006.
- SAMAVATI, L. et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits oxidative phosphorylation through tyrosine phosphorylation at subunit I of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem [S.I.]*, v. 283, n. 30, p. 21134-44, Jul 25 2008.
- SANTIAGO, A. P. et al. Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie [S.I.]*, v. 90, n. 10, p. 1566-77, Oct 2008.
- SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science [S.I.]*, v. 283, n. 5407, p. 1488-93, Mar 5 1999.
- SBARRA, A. J.; KARNOVSKY, M. L. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem [S.I.]*, v. 234, n. 6, p. 1355-62, Jun 1959.
- SCHAEFER, C. F.; BIBER, B. Effects of endotoxemia on the redox level of brain cytochrome a₃ in rats. *Circ Shock [S.I.]*, v. 40, n. 1, p. 1-8, May 1993.
- SCHAEFER, C. F. et al. Dose-related reduction of intestinal cytochrome a₃ induced by endotoxin in rats. *Circ Shock [S.I.]*, v. 33, n. 1, p. 17-25, Jan 1991.

- SCHAPIRA, A. H. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* [S.I.], v. 54, n. 3, p. 823-7, Mar 1990.
- SCHILTZ, J. C.; SAWCHENKO, P. E. Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci* [S.I.], v. 22, n. 13, p. 5606-18, Jul 1 2002.
- SCHULZE-OSTHOFF, K. et al. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* [S.I.], v. 267, n. 8, p. 5317-23, Mar 15 1992.
- SCHUMER, W. et al. Effect of endotoxemia on liver cell mitochondria in man. *Ann Surg* [S.I.], v. 171, n. 6, p. 875-82, Jun 1970.
- _____. Endotoxin effect on respiration of rat liver mitochondria. *J Surg Res* [S.I.], v. 10, n. 12, p. 609-12, Dec 1970.
- SEGAL, A. W.; JONES, O. T. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* [S.I.], v. 276, n. 5687, p. 515-7, Nov 30 1978.
- SEMMLER, A. et al. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat* [S.I.], v. 30, n. 2-3, p. 144-57, Oct 2005.
- SHARMA, L. K. et al. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr Med Chem* [S.I.], v. 16, n. 10, p. 1266-77, 2009.
- SHARSHAR, T. et al. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol* [S.I.], v. 14, n. 1, p. 21-33, Jan 2004.
- _____. Science review: The brain in sepsis--culprit and victim. *Crit Care* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 37-44, Feb 2005.
- SIAMI, S. et al. The encephalopathy in sepsis. *Crit Care Clin* [S.I.], v. 24, n. 1, p. 67-82, viii, Jan 2008.
- SIELENKAMPER, A. W. et al. Diaspirin cross-linked Hb and norepinephrine prevent the sepsis-induced increase in critical O₂ delivery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [S.I.], v. 279, n. 4, p. H1922-30, Oct 2000.
- SINGER, M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med* [S.I.], v. 35, n. 9 Suppl, p. S441-8, Sep 2007.
- SKULACHEV, V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* [S.I.], v. 11, n. 4, p. 473-85, Apr 2006.

- SNYDER, S. H. et al. Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain Res Brain Res Rev* [S.I.], v. 26, n. 2-3, p. 167-75, May 1998.
- SOANE, L. et al. Mechanisms of impaired mitochondrial energy metabolism in acute and chronic neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res* [S.I.], v. 85, n. 15, p. 3407-15, Nov 15 2007.
- SOEJIMA, Y. et al. Local cerebral glucose utilization in septic rats. *Crit Care Med* [S.I.], v. 18, n. 4, p. 423-7, Apr 1990.
- SORIANO, F. G. et al. Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock* [S.I.], v. 17, n. 4, p. 286-92, Apr 2002.
- STOCCO, D. M. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1486, n. 1, p. 184-97, Jun 26 2000.
- SUH, S. W. et al. Pyruvate administered after severe hypoglycemia reduces neuronal death and cognitive impairment. *Diabetes* [S.I.], v. 54, n. 5, p. 1452-8, May 2005.
- SZABO, C. Poly (ADP-ribose) polymerase activation and circulatory shock. *Novartis Found Symp* [S.I.], v. 280, p. 92-103; discussion 103-7, 160-4, 2007.
- TAKEZAWA, J. et al. Amino acids and thiobarbituric acid reactive substances in cerebrospinal fluid and plasma of patients with septic encephalopathy. *Crit Care Med* [S.I.], v. 11, n. 11, p. 876-9, Nov 1983.
- TAYLOR, F. B., JR. et al. Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock* [S.I.], v. 33, n. 3, p. 127-34, Mar 1991.
- TEJADA-SIMON, M. V. et al. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci* [S.I.], v. 29, n. 1, p. 97-106, May 2005.
- TELES, J. M. et al. Surviving sepsis campaign in Brazil. *Shock* [S.I.], v. 30 Suppl 1, p. 47-52, Oct 2008.
- TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. *Nature* [S.I.], v. 420, n. 6917, p. 853-9, Dec 19-26 2002.
- _____. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* [S.I.], v. 117, n. 2, p. 289-96, Feb 2007.
- _____. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 418-28, Jun 2009.
- TRUMBECKAITE, S. et al. Different sensitivity of rabbit heart and skeletal muscle to endotoxin-induced impairment of mitochondrial function. *Eur J Biochem* [S.I.], v. 268, n. 5, p. 1422-9, Mar 2001.

- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol [S.I.]*, v. 552, n. Pt 2, p. 335-44, Oct 15 2003.
- VALLANCE, P. et al. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovasc Res [S.I.]*, v. 23, n. 12, p. 1053-7, Dec 1989.
- VALLIERES, L.; RIVEST, S. Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem [S.I.]*, v. 69, n. 4, p. 1668-83, Oct 1997.
- VAN DEN BERGHE G, WOUTERS P, WEEKERS F, et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med*; 345:1359-1367, 2001.
- VANHOREBEEK, I. et al. Endocrine aspects of acute and prolonged critical illness. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab [S.I.]*, v. 2, n. 1, p. 20-31, Jan 2006.
- VANHOREBEEK, I.; VAN DEN BERGHE, G. The neuroendocrine response to critical illness is a dynamic process. *Crit Care Clin [S.I.]*, v. 22, n. 1, p. 1-15, v, Jan 2006.
- VEAL, E. A. et al. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell [S.I.]*, v. 26, n. 1, p. 1-14, Apr 13 2007.
- VOIGT, K. et al. Decreased plasma and cerebrospinal fluid ascorbate levels in patients with septic encephalopathy. *Free Radic Res [S.I.]*, v. 36, n. 7, p. 735-9, Jul 2002.
- WANG, H. et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med [S.I.]*, v. 10, n. 11, p. 1216-21, Nov 2004.
- WANG, L. et al. The coagulation cascade in sepsis. *Curr Pharm Des [S.I.]*, v. 14, n. 19, p. 1860-9, 2008.
- WEI, J. et al. Endotoxin-stimulated nitric oxide production inhibits expression of cytochrome c oxidase in ANA-1 murine macrophages. *J Immunol [S.I.]*, v. 168, n. 9, p. 4721-7, May 1 2002.
- WELTY-WOLF, K. E. et al. Coagulation blockade prevents sepsis-induced respiratory and renal failure in baboons. *Am J Respir Crit Care Med [S.I.]*, v. 164, n. 10 Pt 1, p. 1988-96, Nov 15 2001.
- WICHTERMAN, K. A. et al. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res [S.I.]*, v. 29, n. 2, p. 189-201, Aug 1980.

- YANG, H. et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 101, n. 1, p. 296-301, Jan 6 2004.
- _____. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 78, n. 1, p. 1-8, Jul 2005.
- YING, W. et al. NAD⁺ as a metabolic link between DNA damage and cell death. *J Neurosci Res* [S.I.], v. 79, n. 1-2, p. 216-23, Jan 1-15 2005.
- YOUNG, G. B. et al. The encephalopathy associated with septic illness. *Clin Invest Med* [S.I.], v. 13, n. 6, p. 297-304, Dec 1990.
- ZAPELINI, P. H. et al. Antioxidant treatment reverses mitochondrial dysfunction in a sepsis animal model. *Mitochondrion* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 211-8, Jun 2008.
- ZHAN, R. Z. et al. Regionally different elevation of intracellular free calcium in hippocampus of septic rat brain. *Shock* [S.I.], v. 6, n. 4, p. 293-7, Oct 1996.
- ZHANG, Q. et al. Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science* [S.I.], v. 295, n. 5561, p. 1895-7, Mar 8 2002.
- ZINGARELLI, B. et al. Protective effects of nicotinamide against nitric oxide-mediated delayed vascular failure in endotoxic shock: potential involvement of polyADP ribosyl synthetase. *Shock* [S.I.], v. 5, n. 4, p. 258-64, Apr 1996.
- ZORATTI, M.; SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1241, n. 2, p. 139-76, Jul 17 1995.

CURRICULUM VITAE

Nome: Joana da Costa Pinto d'Avila

Nascimento: 02 / 01 / 1978

Naturalidade: Rio de Janeiro

⇒ Formação Acadêmica

- Faculdade de Farmácia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Março de 1998 até Novembro de 2002.
- Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Setembro de 2004 até Abril de 2006.
- Doutorado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Abril de 2006 até Novembro de 2009.

⇒ Comunicações em Congressos

5 comunicações em congressos internacionais

7 comunicações em congressos nacionais

⇒ Publicações

D'Avila, J.C.; Santiago, A.P.; Amâncio, R.T.; Galina, A.; Oliveira, M.F. & Bozza, F.A. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med.* 2008 Jun;36(6):1925-32

Soares, J.B.C., Lara F.A., Cunha, P.R.B.B., Atella, G.C., Maya-Monteiro, C.M., **D'Avila, J.C.**, et al. Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *FEBS Letters.* , v.581, p.1742 - 1750, 2007.

Zuckerbraun, B.S.; Chin, B.Y.; Bilban, M ; **D'Avila, J.C.** ; Rao, J.; Billiar, T.R.; Otterbein, L.E. Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *The FASEB Journal*, v. 21, p. 1099-1106, 2007.

Bilban, M.; Bach, F.H.; Otterbein, S.L.; Ifedigbo, E.; **D'Avila, J.C.**; Esterbauer, H.; Usheva, A.; Robinson, S.C.; Otterbein, L.E.; Wagner, O. Carbon Monoxide Orchestrates a Protective Response through PPARγ. *Immunity.* v. 24, p. 601-610, 2006.

Wang, H., Lee, S.S., Dellagnello, C., Tchishopashvili, V., **D'Avila, J.C.**, Czismadia, E., Chin, B.Y., Bach, F.H. Bilirubin Can Induce Tolerance to Islet Allograft. *Endocrinology.* v.147, p.762-768, 2006.

Oliveira, M.F., **D'Avila, J.C.**, Tempone, A.J., Soares, J.B.C., Rumjanek, F.D., Ferreira, S.T., Oliveira, P. L. Inhibition of heme aggregation by chloroquine reduces *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Infectious Diseases.* , v.190(4), p.843, 2004.

Oliveira, M.F., **D'Avila, J.C.**, Torres, C.R., Oliveira, P.L., Tempone, A.J., Rumjanek, F.D., Petretski, M.D., Oliveira, M.A., Souza, W., Ferreira, S.T. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.111, p.217 , 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)