ANDRÉ AUGUSTO BOTÊGA SILVA

Alterações funcionais de mitocôndrias hepáticas na tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos Imunes e Infeciosos
Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

**São Paulo
2017**

ANDRÉ AUGUSTO BOTÊGA SILVA

Alterações funcionais de mitocôndrias hepáticas na tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos Imunes e Infeciosos
Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, André Augusto Botêga

Alterações funcionais de mitocôndrias hepáticas na tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS) / André Augusto Botêga Silva. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos
Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Sepse 2.Tolerância imunológica 3.Mitocôndrias hepáticas
4.Síndrome de resposta inflamatória sistêmica 5.Choque séptico 6.Endotoxinas

USP/FM/DBD-180/17

Meus pais, Clodoaldo Demarchi da Silva e Cláudia Regia Botêga Silva deixaram sonhos, medos, ambições e me fortaleceram para que eu chegasse aonde hoje estou. Meus sonhos são diariamente conquistados em consequência do sacrifício dos seus. Ao longo de todos esses anos vencemos inúmeras tormentas e sempre fomos resilientes. Vocês mais que eu. A eles, dedico.

Nada faria sentido nesse trabalho se a minha profissão não encontrasse fundamentos para a aplicação prática do mesmo. Fazer parte da equipe de uma unidade de tratamento intensivo de animais de pequeno porte deu mais suporte à prática de emergências clínicas. Isso jamais seria possível sem o apoio incondicional da melhor Médica Veterinária que eu conheci ao longo da minha curta carreira profissional, Ana Carina Saito Silvestre, que por ironia do destino se tornou minha namorada. Obrigado por despertar dentro de mim o amor e paixão pela Medicina Veterinária Intensiva. Que nossos caminhos sigam juntos, “de janeiro a janeiro, até o mundo acabar”.

AGRADECIMENTOS

A maior força que move esse mundo cujo nome cada credo atribui conforme seus preceitos e eu nomeio de Deus. Que continue me guiando e dando forças mesmo nos momentos de desespero.

À minha família paulistana que me concede carinho imenso, conversas descontraídas e muito afeto, meus sogros Sr. Antonio Silvestre Neto, D. Yatiyo Saito Silvestre e minha cunhada Ana Raquel Saito Silvestre. E uma especial lembrança *in memoriam* a D. Rosalina Mércia Silvestre Lupetti.

Aos meus avós e padrinhos D. Maria Aparecida Barros Botêga (carinhosamente chamada por “mãe” e agora Vó Cida) e meu melhor amigo Sr. Geraldo Sbompato Botêga (Vô Gê), por me ouvir mesmo sendo o mais teimoso da família toda. Não menos importante, meus avós paternos Sr. João Baptista da Silva (Vô João) e D. Clary Demarchi da Silva (Vó Clary) pelas orações para que tudo desse sempre certo.

Aos meus amigos Alan Souto Consorte e Angélica Lazarini por propiciarem momentos de longas conversas e risos aos finais de semana de folga.

Aos meus amigos de faculdade e república, Fernando Franco Polizel (meu irmão de coração), Marcos de Arruda Somenzari, João Paulo Sampaio Góes e Vitor Franco da Silveira, pelas inesquecíveis histórias e pelos ensinamentos e por compartilharem comigo uma das melhores fases de nossas vidas.

A Dra. Denise Frediani Barbeiro, Dr. Hermes Barbeiro e Dra. Ana Maria Coelho por terem aceito essa empreitada junto a mim dentro do LIM 51 e me ajudarem na interpretação dos resultados e amizade.

Ao meu orientador, Professor Dr. Francisco Garcia Soriano pela disposição, entusiasmo, discussões e por ser um exemplo na carreira acadêmica, pessoal e como médico intensivista.

A todos do LIM 51 que estiveram envolvidos nesse projeto, contribuíram positivamente ou negativamente para que ele fosse executado. Especial agradecimento a Dra. Clara Lorigados por me encorajar a fazer o protocolo de tolerância em ratos *wistar* e por ser mais um exemplo que carrego comigo.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro de todo o projeto.

“A vitalidade é demonstrada não apenas pela persistência, mas pela capacidade de começar de novo.”

Zelda Fitzgerald

André Augusto Botêga Silva. *Alterações funcionais de mitocôndrias hepáticas na tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS)* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O presente estudo tem por objetivo principal avaliar as alterações funcionais precoces de mitocôndrias hepáticas de ratos *wistar* submetidos ao estímulo de sepse através da técnica de ligadura cecal e punção (*cecal ligation and puncture-CLP*) e indução de tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. As mitocôndrias exercem papel na alteração do metabolismo celular de pacientes sépticos. Os objetivos do presente trabalho foram: (1) padronizar a técnica de indução a tolerância para ratos *wistar* com LPS de *E. coli* (2) avaliar a função mitocondrial fosforilativa e oxidativa; (3) quantificar DNA mitocondrial em tecido hepático de animais submetidos à CPL e tolerância; (4) verificar a expressão dos genes responsáveis pela biogênese mitocondrial e replicação do DNA mitocondrial: *nuclear respiratory factor* (NRF-1), *mitochondrial transcription factor A* (TFAM) e *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α); (5) avaliar a função dos complexos respiratórios I e IV. Os resultados encontrados no presente estudo revelaram que: (a) a taxa de mortalidade dos animais submetidos a tolerância foi de 10% quando submetidos à dose letal de LPS, enquanto a taxa de mortalidade dos animais controle foi de 100% quando submetidos à dose letal de LPS; (b) observou-se que o grupo do controle respiratório que recebeu doses controladas de LPS e foi submetido à CLP apresentou razão igual ao grupo Controle, sugerindo que a fosforilação oxidativa se manteve igual ao basal, enquanto o grupo que foi submetido ao procedimento de CLP sem indução a tolerância apresentou piora da razão do controle respiratório em relação ao grupo controle; (c) a quantificação de DNA mitocondrial mostrou-se maior nos animais submetidos a CLP sem prévia indução a tolerância, com igual aumento da expressão dos fatores de biogênese mitocondrial em relação aos demais grupos; (d) houve diferença significativa na avaliação da funcionalidade dos complexo I, porém o complexo IV se manteve igual em todos os grupos. Concluiu-se que a indução a tolerância altera positivamente a função mitocondrial em animais submetidos à CLP.

Descritores: sepse, tolerância imunológica, mitocôndria hepática, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, choque séptico, endotoxina

André Augusto Botêga Silva. *Functional alterations of hepatic mitochondria in lipopolysaccharide tolerance (LPS)* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

The aim of this study was to evaluate the early functional alterations of hepatic mitochondria of *wistar* rats submitted to the stimulation of sepsis through the technique of cecal ligation and puncture (CLP) and induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli*. Mitochondria play a role in altering the cellular metabolism of septic patients. The objectives of the present study were: (1) to standardize the tolerance induction technique for *wistar* rats with *E. coli* LPS (2) to evaluate the mitochondrial phosphorylation and oxidative function; (3) quantify mitochondrial DNA in hepatic tissue of animals submitted to CPL and tolerance; (4) to verify the expression of genes responsible for mitochondria biogenesis and mitochondrial DNA replication nuclear mitochondrial biogenesis (NRF-1), mitochondrial transcription factor A (TFAM) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α); (5) to evaluate the function of respiratory complexes I and IV. The results found in the present study revealed that: (a) the mortality rate of the animals submitted to tolerance was 10% when submitted to the lethal dose of LPS, whereas the mortality rate of the control animals was 100% when submitted to the lethal dose of LPS; (B) it was observed that the group receiving controlled doses of LPS and submitted to CLP presented a ratio equal to the control group, suggesting that oxidative phosphorylation remained the same at baseline, whereas the group that underwent CLP procedure without induction of tolerance presented worsening of the respiratory control ratio in relation to the control group; (C) the mitochondrial DNA quantification was higher in the animals submitted to CLP without prior tolerance induction, with an equal increase in mitochondrial biogenesis factors expression in relation to the other groups; (D) there was significant difference in the evaluation of the functionality of complexes I, but no difference in complex IV in all groups. It was concluded that induction of tolerance positively alters mitochondrial function in animals submitted to CLP.

Descriptors: sepsis, immune tolerance, liver mitochondria, systemic inflammatory response syndrome, septic shock, endotoxins

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 - Sepsis: mecanismos e consequências	16
1.2 – Mecanismos de lesão mitocondrial pós estímulo séptico	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 – Estrutura mitocondrial	21
2.2 – A função mitocondrial	23
2.3 – Complexos Respiratórios e fosforilação oxidativa	24
2.4 – Complexo I – NADH - Ubiquinona-Redutase	26
2.5 – Complexo II – Succinato-Dehidrogenase	27
2.6 – Complexo III – Ubiquinona-Citocromo C Oxidase	28
2.7 – Complexo IV – Citocromo C Oxidase	30
2.8 – DNA Mitocondrial e seus fatores de transcrição	32
2.9 – A tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS)	34
2.10. Alterações mitocondriais na sepsis	35
3. HIPÓTESES	38
4. OBJETIVOS	39
4.1 - Geral	39
4.2 – Específicos	39
5. MÉTODOS	41
5.1- Modelo Biológico	41
5.2 - Anestesia	41
5.3 - Tempo de Estudo	41
5.4 - Constituição dos Grupos e Protocolo Experimental	42
5.5 – Ligadura cecal e perfuração para indução à sepsis	43
5.6 - Avaliação da função mitocondrial	43
5.7 – Padronização da dose de LPS administrada em animais do grupo Tolerante	44
5.8 – Quantificação de mtDNA	44
5.9 – Extração e quantificação de RNA para expressão de TFAM, NRF-1 e PGC-1 α	45
5.10 – Avaliação dos complexos respiratórios I e IV	46
5.11 – Análise estatística	47
6. RESULTADOS	48
6.1 – Padronização da técnica de indução a tolerância	48
6.2 - Função Mitocondrial	49

7. DISCUSSÃO.....	58
7.1 - Efeito da Tolerância na função mitocondrial	59
7.2 - Desacoplamento Mitocondrial na sepse	62
7.3 - Biogênese Mitocondrial.....	66
8. CONCLUSÃO.....	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

Figura 1. Estrutura e organização da mitocôndria.	22
Figura 2. Equação química da redução de NAD em NADH.	25
Figura 3. Estrutura biomolecular do Complexo I.	27
Figura 4. Estrutura biomolecular do Complexo II.	28
Figura 5. Estrutura biomolecular do Complexo III.	29
Figura 6. Estrutura biomolecular do Complexo IV.	31
Gráfico 1. Curva de sobrevivência de animais controle (dose letal de 40mg/kg) e tolerantes (submetidos à dose de 2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por mais 2 dias e dose letal de 40mg/kg no dia 8). $p < 0,05$	48
Gráfico 2: Curva de sobrevivência de animais controle (dose letal de 40mg/kg) e CLP Tolerante (submetidos à dose de 2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por mais 2 dias e CLP no dia 8). $p < 0,05$	49
Gráfico 3. Contagem de DNA mitocondrial em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle.	50
Gráfico 4. Expressão de NRF-1 em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. CLP.	51
Gráfico 5. Expressão de TFAM em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. todos os grupos. .	52
Gráfico 6. Expressão de TFAM em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. todos os grupos. .	52
Gráfico 7. Avaliação do Estágio S3 da respiração mitocondrial através de ratos Wistar controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg	

por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. *p<0,05 vs. Outros grupos..... 54

Gráfico 8: Avaliação do Estágio S4 da respiração mitocondrial através de ratos Wistar controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. *p<0,05 vs. Controle. **p<0,05 vs. CLP 4 HORAS..... 55

Gráfico 9: Avaliação da razão do controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial através de ratos Wistar controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. *p<0,05 vs. Outros grupos..... 56

Gráfico 10. Avaliação do Complexo Respiratório I em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. *p<0,05 vs. todos os grupos. 57

Gráfico 11. Avaliação do Complexo Respiratório IV em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. *p<0,05 vs. todos os grupos. 57

Tabela 1. Contagem do mtDNA a partir de amostras de tecido hepático. Valores expressos em média e erro padrão da média. FMUSP, São Paulo, SP, 2017 49

Tabela 2. Avaliação da expressão dos fatores de biogênese mitocondrial NRF-1, TFAM e PGC-1α. Valores expressos em média e erro padrão da média. FMUSP, São Paulo, SP, 2017. 51

Tabela 3. Avaliação da função mitocondrial através dos estágios respiratórios e consumo de O₂ em mM. Valores expressos em média e erro padrão da média. FMUSP, São Paulo, SP, 2017. 53

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Seps: mecanismos e consequências

A seps consiste em uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) exacerbada decorrente de processos infecciosos. Sua causa mais comum é por bactérias gram-positivas e gram-negativas que desencadeiam um processo inflamatório com liberação de fatores de estresse tecidual (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011).

O lipopolissacarídeo (LPS) e as exotoxinas são liberados normalmente durante a replicação da bactéria e/ou como consequência de sua morte, devido à lise da parede celular. Um dos maiores avanços no entendimento do reconhecimento microbiano pelo sistema imune inato tem sido a identificação de receptores do tipo *Toll* (TLRs), que agem como sensores de alvos moleculares associados a patógenos, reconhecendo e disparando a resposta do hospedeiro (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; CREAGH & O'NEILL, 2006; OPITZ et al., 2009).

Os fatores de estresse tecidual e padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP's) são reconhecidos pelos receptores Toll-Like (TLR's). Esses receptores sinalizam às células do sistema imune por via de citocinas para que a resposta imune inflamatória seja desencadeada (MOGENEN et al., 2009).

A ativação dos macrófagos pelo LPS se dá através da ligação à proteína ligante de LPS (LBP) e interage com o CD-14 (proteína da superfície externa da membrana celular de monócitos que facilita a ativação celular induzida pelo LPS). (ZHANG & MORRISON, 1993). O CD-14 em conjunto com a proteína de diferenciação mielóide-2 (MD-2) uma pequena molécula não transmembranica, participam da apresentação de LPS para o receptor similar ao *Toll*. Em 1998, Poltorak

e colaboradores, mostraram que a sinalização pelo LPS é transmitida pelo receptor *Toll-like-4* (TLR-4) o primeiro membro da família a ser caracterizado em mamíferos.

TLR4 é capaz de ativar vias de sinalização distintas que envolvem diferentes cofatores e moléculas adaptadoras intermediando diversas respostas imunes. Uma das vias de sinalização é a “via de sinalização TLR dependente de MyD88” que é ativada pela ligação direta do domínio TIR citoplasmático com a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP), que recruta a molécula adaptadora MyD88 e de quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAK). Após autofosforilação das IRAK, a proteína adaptadora associada ao receptor de TNF (TRAF6) interage com complexos de proteínas, ativando o complexo I κ B-quinase (IKK) e por fim, ativando o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (KAWAI & AKIRA, 2007). Na sepse todas estas vias estão ativadas, apresentando uma resposta inflamatória exacerbada, pode ocorrer uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS).

Na SIRS, há uma intensa liberação de padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMP's) decorrente da lesão tecidual e apoptose com presença de constituintes intracelulares, tais como as histonas, DNA e as mitocôndrias. Receptores especializados reconhecem os DAMP's e modulam a transcrição de genes para as proteínas envolvidas na inflamação e nos demais sistemas, incluindo o sistema cardiovascular, imunológico e hormonal (BOYAPATI, 2017).

A ativação do sistema hormonal é componente precoce no paciente com sepse. O fluxo sanguíneo para os órgãos envolvidos no mecanismo de luta e fuga é redirecionado. Dessa forma, a liberação da adrenalina e do cortisol como reflexo ao estresse causa um aumento consequente do débito cardíaco. Proteínas de fase aguda envolvidas com defesa e transporte são sintetizadas, bem como há modulação da atividade metabólica, modificando-se a produção protéica pelo fígado. Como

resultado, há maior aporte de glicose e liberação de lactato a partir dos músculos, decorrente da ação das catecolaminas, a fim de proporcionar disponibilidade de substrato para os demais órgãos (JONES, 2012).

O sistema cardiovascular responde de forma macro e microvascular, com aumento significativo do débito cardíaco e redistribuição do fluxo sanguíneo. Essa situação pode ser agravada com a perda de líquido exógena (através de sudorese, vômito, diarreia, por exemplo). Alterações no tônus vascular e na barreira endotelial fazem com que haja intenso fluxo do interstício para a circulação sistêmica, objetivando “varrer” o tecido infectado ou danificado. A distribuição de fluxo sanguíneo na sepse se dá de forma não homogênea, ocorrendo hipofluxo em alguns territórios e órgãos, que junto a inflamação podem desencadear a disfunção de múltiplos órgãos (MODS) e consequente óbito do paciente (MACIEL et al., 2006)

Outros subprodutos da SIRS incluem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS) como óxido nítrico e superóxidos, produzidas em quantidades supranormais. As ROS afetam a funcionalidade das proteínas com efeitos pós-transcricionais, alterando a oxidação, nitrosilação, nitração, acetilação, causando danos diretos aos constituintes celulares, inclusive às mitocôndrias. Todos esses fatores podem levar a um feedback negativo direto resultante de uma redução na demanda metabólica, em parte, causada por uma exigência mitocondrial diminuída para o oxigênio (LANDRY, 2001).

1.2 – Mecanismos de lesão mitocondrial pós estímulo séptico

As disfunções mitocondriais foram descritas em vários modelos animais de sepse. Foram reportados danos ultraestruturais de mitocôndrias hepáticas de

pacientes que morreram em decorrência de sepse e apresentavam disfunções de fosforilação oxidativa e alteração na depleção de antioxidantes. Danos mitocondriais associados a estresse oxidativo são fatores fundamentais na fisiopatologia da disfunção de múltiplos órgãos na sepse, sugerindo que uma terapia com administração de antioxidantes fosse estabelecida. Apesar disso, a suplementação com sequestradores de radicais livres mostrou-se ruim na sobrevivência de pacientes críticos, especialmente por estes não atingirem o sítio de maior dano oxidativo: a mitocôndria (EXLINE & CROUSER, 2008).

Inúmeros estudos sugerem que há aumento das espécies reativas de oxigênio na sepse – tanto na mitocôndria, na célula, em modelos animais e em pacientes. Ainda que desconsiderados os danos intracelulares causados pela sepse, a combinação de vasodilatação, obstrução do fluxo sanguíneo periférico, redistribuição, dano endotelial, hipovolemia e edema intersticial contribuem para a hipoxia tecidual e geração de novas espécies reativas de oxigênio (KUMARAN et al., 2016). Após a ressuscitação volêmica do paciente séptico e reperfusão, a produção de ROS é potencialmente maior, especialmente os superóxidos, como peróxido de hidrogênio, radicais de hidróxido e óxido nítrico. Além de conduzirem a oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, as ROS também agem como moduladores fisiológicos de algumas funções mitocondriais. Por exemplo, H_2O_2 , que é originada na mitocôndria predominantemente através da supeóxido desmutase, estimula a liberação de Ca^{+2} de mitocôndrias intactas. A produção excessiva de ROS combinada com um aumento da liberação/captação de Ca^{+2} irá resultar em apoptose e necrose, contribuindo substancialmente para as injúrias de isquemia e reperfusão (KALOGERIS et al., 2012).

Como há uma diminuição drástica do aporte de ATP, dá-se início ao processo de morte celular. Não é possível comprovar que a disfunção de múltiplos órgãos é causada diretamente pela disfunção mitocondrial, visto que a produção de ATP através da atividade glicolítica pode manter as células viáveis por algum período de tempo. Entretanto, por essa via de produção não conseguir produzir a quantidade necessária de energia uma das causas indiretas da síndrome da disfunção múltipla dos órgãos está associada a perda da função mitocondrial (SINGER, 2014).

Estudos recentes apontam que há significativa correlação entre o grau de comprometimento mitocondrial ou dano histológico com a disfunção orgânica e prognóstico ruim do paciente. Ratos submetidos à peritonite por *Staphylococcus aureus* apresentaram disfunção dos órgãos e diminuições da taxa metabólica e massa mitocondrial, sendo que a melhora clínica sempre veio precedida de aumento nos níveis de marcadores de biogênese mitocondrial, tais como PGC-1 α , TFAM e NRF-1. Dessa forma, pode-se afirmar que a biogênese mitocondrial é parte do processo de recuperação do paciente em sepse (PARK, 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Estrutura mitocondrial

As mitocôndrias são as principais organelas responsáveis por fornecimento de energia na célula. Em todas as células eucariotas que não dependem da fotossíntese, as mitocôndrias são a principal fonte de adenosina-tri-fosfato (ATP), uma molécula rica em energia que rege as funções celulares fundamentais. Essas funções incluem a geração de força (por exemplo, na contração muscular e na divisão celular), a biossíntese, dobradura e degradação de proteínas e a geração e manutenção de potenciais de membrana (LODISH et al., 2000). O ATP é gerado da fosforilação oxidativa da molécula de ADP (adenosina-di-fosfato). Além da respiração celular e síntese de ATP, as mitocôndrias possuem inúmeras outras funções essenciais, incluindo a produção de NADH e GTP no ciclo do ácido cítrico, a biossíntese de aminoácidos, grupos de heme e aglomerados de ferro-enxofre e a síntese de fosfolípidos para a biogênese da membrana. Eles também atuam em sinalização de cálcio [1], respostas de estresse [2] e geralmente como sítios de sinalização celular [3]. Além disso, as mitocôndrias estão profundamente implicadas na apoptose e no envelhecimento [4] (LODISH et al., 2000).

Figura 1. Estrutura e organização da mitocôndria.¹

As mitocôndrias são separadas do citoplasma pela membrana mitocondrial externa e interna. A membrana externa é porosa e livremente atravessada por íons e pequenas moléculas não carregadas através de proteínas de membrana formadoras de poros (porins). Moléculas maiores, especialmente proteínas, devem ser importadas por translocases especiais. Devido à sua porosidade, não há potencial de membrana na membrana externa. Em contraste, a membrana interna é uma barreira de difusão para todos os íons e moléculas. Estes só podem ultrapassar com a ajuda de proteínas de transporte de membrana específicas, cada uma das quais é seletiva para um íon ou molécula particular. Como resultado da sua seletividade iônica, um potencial de membrana eletroquímica de cerca de 180 mV se acumula através da membrana mitocondrial interna. Na membrana interna ocorre a fosforilação oxidativa em um conjunto de complexos de proteína de membrana que criam gradiente eletroquímico através da membrana (ALBERTS et al., 2002).

¹ Disponível em: <https://fwcdscience.wikispaces.com/Mitochondria>. Acesso 10 de julho de 2017.

2.2 – A função mitocondrial

A descoberta em 1948 por Eugene Kennedy e Albert Lehninger de que as mitocôndrias são o local de fosforilação oxidativa em eucariotas marcou o início da fase moderna de estudos em metabolismo de energia biológica. A matriz mitocondrial, encerrada pela membrana interna, contém o complexo piruvato desidrogenase e as enzimas do ciclo do ácido cítrico, a via de oxidação dos ácidos graxos e as vias de oxidação dos aminoácidos - todas as vias oxidativas, com exceção da glicólise, que ocorre no citosol.

Tecidos com alta demanda de metabolismo aeróbico (cérebro, músculo esquelético e cardíaco e olho, por exemplo) contêm muitas centenas ou milhares de mitocôndrias por célula e, em geral, as mitocôndrias de células com alta atividade metabólica têm mais cristas. Durante o crescimento e divisão celular, as mitocôndrias dividem-se por fissão (como bactérias) e, em algumas circunstâncias, as mitocôndrias individuais se fundem para formar estruturas maiores e mais extensas (MAGNER, 2011).

Nas células dos mamíferos, 80% da ATP é produzida pela fosforilação oxidativa da cadeia respiratória mitocondrial. O restante é fornecido pela degradação anaeróbica citosólica de nutrientes, principalmente pela via da glicólise. A respiração mitocondrial realiza a oxidação completa de substratos, derivados de nutrientes, liberando H_2O , CO_2 e NH_3 . As mitocôndrias também realizam os passos iniciais da biossíntese da ureia. Estes produtos catabólicos finais são excretados do corpo, impedindo assim, sob condições normais, a acumulação deletéria de metabólicos como radicais de oxigênio, ácidos orgânicos e NH_3 (ALBERTS, 2002).

2.3 – Complexos Respiratórios e fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa começa com a entrada de elétrons na cadeia de transportadores de elétrons chamada cadeia respiratória. A maioria destes elétrons surgem da ação de desidrogenases que se ligam a receptores da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD ou NADP) ou flavina-adenina dinucleótido (FMN ou FAD) (PRASAI, 2017).

A maioria das desidrogenases que atuam no catabolismo são específicas para receptores NAD e estão localizadas no citosol ou na própria mitocôndria. As desidrogenases quebram a molécula de NAD liberando dois átomos de hidrogênio. Um destes é convertido de íon hidreto (:H) para NAD, e o outro é libertado como H no meio (Figura 1). NADH e NADPH são portadores de elétrons solúveis em água que se associam reversivelmente com desidrogenases. O NADH transporta elétrons de reações catabólicas para o início da cadeia respiratória. A NADPH geralmente fornece elétrons para reações anabólicas. As células mantêm reservas separadas de NADPH e NADH, com diferentes potenciais de redução. Isto é obtido mantendo a razão [forma reduzida]/[forma oxidada] relativamente elevada de NADPH e relativamente baixa de NADH. Nem NADH nem NADPH podem atravessar a membrana mitocondrial interna, mas os elétrons que carregam podem ser transportados indiretamente (STAINS, 2012).

Figura 2. Equação química da redução de NAD em NADH².

O gradiente de prótons através da membrana de crista é gerado por três grandes complexos de proteínas de membrana da cadeia respiratória nas cristas, conhecidos como complexo I (NADH/ubiquinona oxidoreductase), III (citocromo-redutase) e IV (citocromo C oxidase). Complexo I transfere os elétrons da molécula transportadora solúvel em NADH para a cadeia respiratória e os transfere para um composto fenol na membrana. A energia liberada na reação de transferência de elétrons é utilizada para bombear quatro prótons da matriz para o lúmen da crista. O complexo III tira os elétrons do fenol reduzido e os transfere para o pequeno citocromo c da proteína transportadora de elétrons solúvel, bombeando um próton no processo. Finalmente, o complexo IV transfere os elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular e contribui para o gradiente de prótons usando quatro prótons por molécula de oxigênio consumida para produzir água. O complexo II (succinato desidrogenase) transfere os elétrons do succinato diretamente para o fenol e não contribui para o gradiente de prótons (GARDNER, 1997; GARCIA, 2010).

² Disponível em: <https://biology.stackexchange.com/questions/39848/why-does-nad-become-reduced-if-it-gains-a-hydrogen-proton>. Acesso em 10 de julho 2017.

2.4 – Complexo I – NADH - Ubiquinona-Redutase

O Complexo I, também chamado NADH:ubiquinona oxidoreductase ou NADH desidrogenase, é uma grande enzima composta de 42 cadeias polipeptídicas diferentes. O complexo I tem forma de L, com um apêndice do L na membrana e o outro estendendo-se para dentro da matriz (NELSON & COX, 2014).

O complexo I é um marcapasso regulável da função respiratória mitocondrial (HÜTTEMANN et al., 2007), é um importante local de produção de superóxido (CADENAS E DAVIES, 2000) e está envolvido na apoptose (ANGELL et al., 2000; FEARNLEY et al., 2001; PALMISANO et al., 2007) e ao declínio funcional decorrente da idade (PAPA, 1996; VENTURA et al., 2002).

Os elétrons passam do complexo I para um transportador (Coenzima Q) incorporado por si só na membrana. Os elétrons da coenzima Q são passados para um complexo III que está associado a translocação de prótons. Vale ressaltar que o caminho dos elétrons é do Complexo I à Coenzima Q ao Complexo III. O complexo II, succinato desidrogenase, é um ponto de partida separado e não faz parte da via NADH (POTOCKÁ, 2007) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura biomolecular do Complexo I.³

2.5 – Complexo II – Succinato-Dehidrogenase

O Complexo II, conhecido como succinato desidrogenase, é a única enzima ligada à membrana presente no ciclo do ácido cítrico (antigamente conhecido por Ciclo de Krebs). Embora menor e mais simples do que o Complexo I, contém cinco grupos prostéticos (compostos de moléculas não-protéicas) de dois tipos e quatro subunidades de proteínas diferentes. As subunidades C e D são proteínas de membrana integrais, cada uma com três hélices. Contêm um grupo de heme, e um local de ligação para a ubiquinona, acoplador de elétrons ao final da reação catalisada pelo Complexo II. As subunidades A e B se estendem para a matriz; contêm três centros 2Fe-2S, FAD e um sítio de ligação para o succinato. Os elétrons são transportados do succinato para FAD e, em seguida, migram dos centros Fe-S para o sítio de ligação Q (BERG et al., 2002) (Figura 3).

³ Disponível em: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/mitochondria/mitets.html>. Acesso em 10 de julho de 2017.

Figura 4. Estrutura biomolecular do Complexo II.⁴

Quando comparado ao complexo I e ao complexo III, o complexo II mostrou-se pouco participativo para a formação de O_2/H_2O_2 por mitocôndrias isoladas de mamíferos e partículas mitocondriais sob condições fisiológicas (SANT PIERRE, 2002). No entanto, as mutações no complexo II podem levar a maiores taxas de formação de O_2 e estão associadas a estados patológicos (RUSTIN, 2002). Dados recentes indicam que o complexo II é parcialmente responsável pela formação de O_2/H_2O_2 succinato-dependente na presença de rotenona, que anteriormente foi atribuída a um fluxo de elétrons reverso do complexo II ao complexo I (MORENO-SANCHEZ, 2013).

2.6 – Complexo III – Ubiquinona-Citocromo C Oxidredutase

O complexo III, também chamado de complexo de citocromo bc1 ou ubiquinona-citocromo c oxidoredutase, acopla a transferência de elétrons do ubiquinol

⁴ Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complex_II.svg. Acesso em 10 de julho de 2017.

(QH₂) para o citocromo c com o transporte vetorial de prótons da matriz para o espaço intermembrana. A unidade funcional do Complexo III é um dímero, com as duas unidades monoméricas do citocromo b que contemplam uma espécie de "canal" no meio da membrana, em que a ubiquinona é livre para se mover do lado da matriz da membrana (ligante QN em um monômero) para o espaço intermembrana (ligante QP do outro monômero) (BERG et al., 2002) (Figura 4).

Figura 5. Estrutura biomolecular do Complexo III.⁵

O centro de reação de ubiquinol (chamado Qp ou Qo) está localizado no lado positivo da membrana (espaço intermembrana), enquanto o centro de redução de ubiquinona (Qn ou Qi) está localizado no lado negativo da membrana (matriz). As transferências de elétrons no complexo III ocorrem de acordo com o ciclo Q proposto por Mitchell em 1975 a partir da oxidação do ubiquinol, através da doação de um elétron à proteína Rieske Fe-S, levando à formação de ubisemiquinona, seguida da redução de Citocromo b e formação de ubiquinona. A taxa de formação de O₂/H₂O₂ pelo complexo III é de cerca de 10% da mediada pelo complexo I, mas aproximadamente igual à do complexo I para a respiração dependente de NADH em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de rato (QUINLAN et al., 2013). O uso

⁵ Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complex_III_et.png#. Acesso em 10 de julho de 2017

de inibidores levou à proposta de que o sítio de produção de O_2 pelo complexo III seja através da ubisemiquinona formada no sítio Q_o (BLEIER & DROSE, 2013). Ao contrário do complexo I que libera O_2 exclusivamente para a matriz, estudos usando mitocôndrias isoladas mostraram que o complexo III libera O_2 para ambos os lados da membrana (SAINT-PIERRRE et al. 2002; MÜLLER et al., 2004) uma vez que a membrana interna não é permeável a O_2 (TAKAHASHI & ASADA, 1983).

2.7 – Complexo IV – Citocromo C Oxidase

No passo final da cadeia respiratória, o Complexo IV, também chamado de citocromo oxidase, transporta elétrons do citocromo c ao oxigênio molecular, reduzindo-o para H_2O . O complexo IV é uma enzima grande (13 subunidades) da membrana mitocondrial interna. As bactérias contêm uma forma muito mais simples, com apenas três ou quatro subunidades, mas ainda capaz de catalisar a transferência de elétrons e o bombeamento de prótons. A comparação dos complexos mitocondriais e bacterianos sugere que três subunidades são críticas para a manutenção da função mitocondrial (BERG, 2002).

Figura 6. Estrutura biomolecular do Complexo IV.⁶

A subunidade II mitocondrial contém dois íons Cu complexados com os grupos -SH de dois resíduos Cys em um centro binuclear (CuA, Fig. 5) que se assemelha aos centros 2Fe-2S de proteínas ferro-enzofre. A Subunidade I contém dois grupos de heme, designados a e a₃, e outro íon de cobre (CuB). Heme a₃ e CuB formam um segundo centro binuclear que acopla elétrons de Heme a e os transfere para O₂ ligado a heme a₃. A transferência de elétrons através do Complexo IV é do citocromo c ao centro de CuA, ao Heme a₃-CuB e finalmente ao O₂. Para cada quatro elétrons que passam por este complexo, a enzima consome quatro "substratos" H⁺ da matriz (lado N) na conversão de O₂ em 2H₂O. Ele também usa a energia desta reação de redox para bombear um próton para fora no espaço intermembranar (lado P) para cada elétron que passa, aumentando o potencial eletroquímico (NELSON & COX, 2014).

Os complexos I, III e IV aparentemente podem se associar para formar uma estrutura denominada respirassoma (SCHÄGGER & PFEIFFER, 2000). A perda do complexo III impede a formação de respirassoma e leva a uma redução significativa

⁶ Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Complex_IV.svg. Acesso em 10 de julho de 2017.

do complexo I (SCHÄGGER et al., 2004; ACÍN-PÉREZ et al., 2004). A possível implicação funcional da forma dimérica dos complexos III, IV e V e da associação dos complexos I, III e IV no respirassoma está sob investigação em vários laboratórios. A partir da descoberta das respirassomas é importante considerar que os complexos respiratórios já não devem ser analisados individualmente, pois a alteração em um deles pode alterar significativamente a atuação de outros (LENAZ, 2010).

2.8 – DNA Mitocondrial e seus fatores de transcrição

A mitocôndria tem um DNA próprio localizado em sua matriz. Em contraste com o genoma nuclear humano, que consiste em 3,3 bilhões de pares de bases de DNA, o genoma mitocondrial humano é construído de apenas 16.569 pares de bases (CHIAL & CRAIG, 2008).

Os principais fatores de transcrição para a biogênese mitocondrial podem ser divididos em duas classes. A primeira classe contém fatores auxiliares de núcleo que se translocam para mitocôndrias e atuam sobre o genoma mitocondrial para facilitar a transcrição e tradução de mtDNA. A segunda classe inclui fatores de transcrição nuclear que atuam sobre o genoma nuclear e controlam diretamente a expressão gênica respiratória. Além dessas duas classes de fatores de transcrição, outra família de proteínas nucleares necessárias para manter a biogênese mitocondrial são os coativadores, que interagem com fatores de transcrição e induzem sua atividade transcricional (DIAZ & MORAES, 2008).

A transcrição do mtDNA é um processo bidirecional regulado por fatores codificados no núcleo, porém localizados na mitocôndria, tais como o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), o fator de transcrição mitocondrial B1 (TFB1M), o

fator de transcrição mitocondrial B2 (TFB2M) e fator de terminação da transcrição mitocondrial (mTERF) (SCARPULLA, 2011). O RNA-polimerase mitocondrial e o Tfam são necessários para ativar a transcrição do mtDNA.

Além dos fatores de transcrição, coativadores induzem sinergicamente expressões de genes que constituem diretamente o aparelho respiratório mitocondrial. Em particular, os fatores de transcrição, como os fatores de respiração nuclear 1 e 2 (NRF-1, NRF-2) e receptor α (ERR α) relacionado ao estrogênio, se ligam aos promotores alvo e ativam a expressão dos genes respiratórios. Os coativadores da transcrição, incluindo o coeficiente de ativação proliferativo peroxissômico γ [PPAR γ], coativador-1 α (PGC-1 α), PPAR γ coativador-1 β (PGC-1 β) e o coativador relacionado com PGC-1 (PRC), não interagem diretamente com o DNA, mas se ligam aos fatores de transcrição para modular sua atividade e expressão. A interação entre essas duas famílias de proteínas nucleares desempenha papéis importantes na coordenação da transcrição de genes mitocondriais (JORNAYVAZ & SCHULMAN, 2010).

Os fatores iniciais de transcrição implicados na regulação de genes mitocondriais são os fatores respiratórios nucleares, NRF-1 e NRF-2. O NRF-1 foi identificado através da busca de fatores de transcrição que controlavam as expressões dos genes citocromo c e citocromo oxidase (EVANS & SCARPULLA, 1990). Verificou-se que o NRF-1 se ligava como um homodímero a uma sequência palindromica dentro do promotor do citocromo c e funciona como um regulador positivo da transcrição do citocromo c. Estudos subsequentes ligaram o NRF-1 a expressões da maioria dos genes que codificam as subunidades essenciais dos complexos respiratórios I-IV. O NRF-1 também é necessário para a transcrição de genes que codificam componentes da membrana externa mitocondrial, como TOMM20 e

COX17, reguladores de proteínas necessárias para a função mitocondrial (KELLY & SCARPULLA, 2004; TAKAHASHI et al., 2002; TRUSCOTT et al., 2003). Além disso, o NRF-1 atua sobre promotores de Tfam, TFB1/2M e POLRMT, cujos produtos, como mencionado anteriormente, desempenham papéis importantes na transcrição de genes mitocondriais (GLEYZER et al., 2005; VIRBASIOUS & SCARPULLA, 1994).

Os coativadores são proteínas nucleares multifuncionais que atuam sobre os fatores de transcrição de ligação do DNA para regular a sua transcrição. O principal avanço na pesquisa de regulação do ERRa veio com a descoberta de PGC-1 α , que é membro de uma família de coativadores de transcrição que também inclui PGC-1 β e PRC. Além disso, o PGC-1 α é capaz de induzir biogênese mitocondrial, regular a capacidade respiratória e oxidação de ácidos graxos (PUIGSERVER et al., 1998; RUSSELL et al. 2004).

2.9 – A tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS)

O lipopolissacarídeo (LPS) de várias famílias microbianas gram-negativas é constituído de uma porção de polissacarídeo ligado covalentemente com o lipídeo A (LA). A membrana externa da bactéria apresenta a cadeia O que é característica e única para cada sorotipo bacteriano e o LA que representa o princípio endotóxico do LPS (WHITE & DENCHEMKO, 2014).

A resistência ao LPS pode ser determinada geneticamente ou adquirida. Nossos estudos mostraram que animais de experimentação que foram submetidos a doses controladas de LPS induziram um estado de resistência adquirida e se tornaram resistentes a doses letais (MELO et al., 2010).

As fases inicial e tardia de tolerância com características diferentes seguem a injeção inicial do LPS. A fase inicial pôde ser detectada dentro das primeiras 24 horas

depois de exposição ao LPS e durou até 8 dias. A tolerância ao LPS relaciona-se à produção e liberação reduzida de citocinas pelos fagócitos em re-exposição ao LPS (MELO et al., 2010).

Não há estudos que elucidem o papel da mitocôndria na tolerância ao LPS e sepse. Entretanto, estudos recentes apontam que o aporte de ATP no paciente séptico é um dos fatores ligados ao prognóstico.

2.10. Alterações mitocondriais na sepse

A disfunção mitocondrial tem sido descrita como um mecanismo causador de redução da atividade de células imunes na sepse. Vários estudos demonstraram redução da atividade respiratória mitocondrial de células imunitárias do sangue periférico nos estágios iniciais de pacientes sépticos admitidos na UTI (SINGER, 2014; MERZ et al., 2017). Os resultados são, no entanto, um pouco divergentes, provavelmente refletindo diferenças na população estudada, sítio experimental e quais marcadores específicos de mitocôndrias foram escolhidos para a avaliação da respiração. A evolução da função respiratória mitocondrial em células imunes nos estágios posteriores da sepse ainda é amplamente desconhecida. Além disso, fica claro a partir de vários estudos que a sepse induz uma resposta de biogênese em que a massa, o número e/ou a função mitocondrial aumentam após a fase inicial do evento séptico (SJÖVALL, 2013).

Mensurações seriadas da pressão parcial de O₂ sanguínea mostram que a quantidade de oxigênio se mantém preservada, em alguns estudos até aumentada, em pacientes em choque séptico sugerindo que o consumo de O₂ talvez esteja prejudicado e não propriamente a disponibilidade de O₂. A inabilidade das células não

conseguirem aproveitar o O₂ circulante é chamada de hipoxia citopática. Vários fatores podem desencadear essa inabilidade e vários estudos descrevem os possíveis mecanismos dessa disfunção, especialmente advindos de disfunções mitocondriais (OSPINA-TASCON et al., 2015).

Vários mecanismos subjacentes têm sido propostos para explicar a hipóxia citopática em sepse (FINK, 2002). Esses incluem:

- dano ultrastrutural às membranas mitocondriais, permitindo uma translocação entre os prótons da membrana interna da mitocôndria (SINGER, 2014);
- desarranjos do complexo piruvato desidrogenase (SINGER, 2014);
- inibição de enzimas do ciclo de ácido cítrico ou o ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons pelo óxido nítrico (NO) (AZEVEDO, 2010; GALLEY et al., 2011);
- inibição de complexos mitocondriais pelo peroxinitrito (CROUSER, 2004);
- danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) (GALLEY, 2004); e
- ativação da PARP-1 (SINGER, 2007).

Estudos prévios demonstram que a estrutura mitocondrial é fator condicional para seu bom funcionamento e a perda dessa estrutura compromete completamente a função (KÜLBRANDT, 2015).

Primeiramente, a piruvato-desidrogenase estaria inibida levando a um aumento do lactato sanguíneo reduzindo assim a atividade energética mitocondrial. Um segundo mecanismo envolveria a ativação da enzima polimerase 1 causando ruptura do DNA e consequentemente apoptose celular, liberação de mediadores

inflamatórios e espécies reativas de oxigênio, principalmente peroxinitrito, radical altamente citotóxico. A ativação dessa enzima reduziria a disponibilidade de NADH levando a inibição do complexo respiratório I. Finalmente, as endotoxinas são responsáveis pela indução da enzima óxido nítrico sintase que aumenta a disponibilidade de óxido nítrico que se liga ao complexo respiratório IV e limita sua funcionalidade (SINGER, 2007).

O complexo respiratório IV é responsável pela redução do oxigênio em água e sua inibição poderia levar uma disfunção mitocondrial e falência energética através de estresse oxidativo, mesmo num ambiente rico em oxigênio. Além desse fator, a interação do óxido nítrico com oxigênio geraria mais disponibilidade de peroxinitrito levando ao ciclo de inibição do complexo respiratório I (RAHAL, 2014).

O controle adequado de todos esses mecanismos é relevante para que haja sobrevivência celular, correta perfusão tecidual e distribuição de oxigênio aos tecidos.

O objetivo do presente estudo é avaliar a função mitocondrial em modelo experimental previamente submetido ao protocolo de indução a tolerância ao lipopolissacarídeo.

3. HIPÓTESES

- I. A tolerância aumenta a expressão de fatores de transcrição e coativadores de DNA mitocondrial;
- II. A tolerância predispõe a maior taxa de mtDNA em hepatócitos;
- III. A indução da tolerância ao lipopolissacarídeo altera a função mitocondrial;
- III. O complexo I e IV altera sua atividade quando a mitocôndria passa pelo processo de tolerância.

4. OBJETIVOS

4.1 – Geral

Avaliar a função mitocondrial após o estímulo de sepse moderada induzida pela técnica de Cecal Ligation and Puncture (CLP) e após a indução da tolerância ao lipopolissacarídeo. Verificar os danos mitocondriais a nível de complexos respiratórios e produção de adenosina-tri-fosfato (ATP).

4.2 – Específicos

4.2.1- Estudar a ação dos complexos I e IV.

Justificativa: o complexo I é o inicial na cadeia respiratória e o complexo IV é parte do processo final da cadeia respiratória. Para tanto iremos buscar alterações nesses complexos.

Estratégia: utilizar o método de espectrofotometria para avaliar a reação do complexo I e IV quando colocado em substrato específico.

4.2.2- Estudar a função mitocondrial através da relação conversão ADP/ATP na tolerância ao LPS;

Justificativa: a taxa de produção de ATP é fator prognóstico do paciente em sepse. Uma forma de se desenvolver a tolerância ao LPS é otimizando a produção de ATP.

Estratégia: avaliar a função oxidativa e fosforilativa das mitocôndrias hepáticas.

4.2.3 – Padronizar a técnica de indução à tolerância para ratos;

Justificativa: várias técnicas de indução a tolerância estão descritas na literatura, entretanto a técnica com LPS de *E. coli* para ratos *wistar* ainda é pouco padronizada.

Estratégia: verificar a dose de LPS para ratos e realizar uma curva de mortalidade.

4.2.4 – Avaliar a expressão gênica dos fatores de biogênese mitocondrial TFAM (mitochondrial transcription factor), NRF-1 (nuclear respiratory factor) e PGC1-alfa (peroxisome gamma coactivator).

Justificativa: o estímulo inflamatório da sepse ativa vários mecanismos de indução a biogênese mitocondrial.

Estratégia: avaliar por RT-PCR a expressão gênica dos fatores de biogênese mitocondrial previamente descritos na literatura

4.2.5 – Quantificar o número de mitocôndrias através da dosagem de DNA mitocondrial disponível no tecido hepático.

Justificativa: verificar a quantidade de mitocôndrias disponíveis e, após, correlacionar com a função.

Estratégia: realizar a contagem de DNA mitocondrial através de RT-PCR.

5. MÉTODOS

5.1- Modelo Biológico

Foram selecionados ratos machos Wistar, pesando entre 200-230 gramas provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas por pelo menos dois dias, em local com temperatura e ciclo de luz controlados, recebendo água e comida *ad libitum*, e permaneceram durante o experimento no Biotério de Manutenção do LIM 17 – Disciplina de Reumatologia, sob responsabilidade do biólogo Antônio dos Santos Filho.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo The Universities Federation for Animals Welfare (UFAW). Nosso projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). Protocolo de Pesquisa nº 056/14.

5.2 - Anestesia

Para o tratamento dos animais submetidos ao procedimento de Cecal Ligation and Puncture (CLP), os animais foram anestesiados com xilazina a 20mg/ml (10mg/kg) e quetamina a 50mg/ml (80mg/kg). Em casos de necessidade de repique, foram utilizados volumes fixos de quetamina (0,05ml).

5.3 - Tempo de Estudo

Os ensaios foram realizados após 4 horas da realização do procedimento de ligadura cecal e perfuração.

5.4 - Constituição dos Grupos e Protocolo Experimental

Cada grupo foi constituído por 10 animais.

5.4.1 - Grupo CLP 4 horas:

Os ratos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). Os animais foram eutanasiados 4 horas após o tratamento e realizada a coleta do material.

5.4.2 - Grupo CLP Tolerante 4 horas

Os ratos receberam 2mg/kg de Lipopolysaccharide (LPS) de *Escherichia coli* (serotype 026:B6/Sigma) durante 3 dias e 5mg/kg por mais 2 dias. Ficaram mais 2 dias sem receber nenhum tratamento e no dia 8 foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). Após 4 horas foram eutanasiados e a coleta do material foi realizada.

5.4.3 - Grupo Tolerante:

Os ratos receberam 2mg/kg de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (serotype 026:B6/Sigma) durante 3 dias e 5mg/kg por mais 2 dias. Ficaram mais 2 dias sem receber nenhum tratamento e no dia 8 foram eutanasiados e a coleta do material foi realizada.

5.4.4 - Grupo Controle:

Os ratos não receberam nenhum tipo de insulto ou tratamento.

5.5 – Ligadura cecal e perfuração para indução à sepse

Sob condições antissépticas, uma incisão de 1 a 2 cm na linha alba foi realizada para expor o ceco juntamente com o intestino. O ceco foi firmemente ligado com fio de seda 3.0 (Ethicon; Johnson & Johnson, USA) abaixo da válvula ileocecal e em seguida perfurado duas vezes (na porção superior e inferior) com uma agulha 18G gauge (Becton Dickinson, EUA). O ceco foi devolvido para a cavidade peritoneal e a laparotomia foi suturada com fio de seda 4-0. Os animais foram devolvidos às suas gaiolas com livre acesso a comida e água.

5.6 - Avaliação da função mitocondrial

O consumo de oxigênio pela mitocôndria foi determinado através do estudo polarográfico da mitocôndria, utilizando o oxígrafo 5/6 H (Gilson Medical Electronics, Inc) com eletrodo de oxigênio em temperatura controlada a 28° C (Clarck, Yellow Springs Instruments Co, Yellow Springs, Ohio), conforme descrito por Coelho em 2010.

À suspensão de mitocôndrias foi acrescentada ao meio da reação no compartimento de vidro do eletrodo de oxigênio deixando somente o *pellet* no tubo. A seguir, foi adicionado substrato energético com succinato de potássio, e o estado basal (Estado 4, S4) da respiração mitocondrial foi registrado.

A fosforilação do ADP em ATP, observada no estado ativado da respiração mitocondrial (Estado 3, S3), foi induzida pelo acréscimo de adenosina difosfato (ADP, Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri). Quando do esgotamento de todo o ADP do meio, a respiração independente de ADP (S4) foi registrada novamente pelo oxígrafo.

A razão do controle respiratório (RCR) e a razão ADP/consumo de oxigênio (ADP/O) foram consideradas como índices das funções oxidativas e fosforilativas mitocondriais. A RCR foi calculada como razão entre a velocidade do consumo de oxigênio na presença de ADP (S3) e a velocidade do consumo de oxigênio na ausência de ADP (S4).

5.7 – Padronização da dose de LPS administrada em animais do grupo Tolerante

Para indução da tolerância, os animais foram submetidos a doses controladas de Lipopolysaccharide (LPS) de *Escherichia coli* (serotype 026:B6/Sigma), durante 5 dias no seguinte protocolo: dia 1, 2 e 3 receberam 2mg/kg do LPS por via intraperitoneal. Nos dias 4 e 5 receberam 5mg/kg do LPS por via intraperitoneal. Para verificar a eficácia da tolerância, foi realizada uma curva de mortalidade em que os animais recebiam no dia 8 uma dose de 40mg/kg. A dose letal só foi utilizada nos animais utilizados na confecção da curva de mortalidade (n=20 para cada grupo).

5.8 – Quantificação de mtDNA

As quantidades relativas de mitocôndrias do fígado de ratos foram determinadas usando métodos quantitativos de PCR em tempo real (RT-PCR) descritos por Wong e Cortopassi em 2010. Os genes alvo foram fibrose cística nuclear (FC) e nicotinamida adenina dinucleotideo desidrogenase-5 mitocondrial (ND-5).

As sequencias específicas para as espécies foram seleccionados utilizando o Primer Express® Software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para a quantificação do DNA nuclear, utilizou-se 10 ng de DNA como molde e para quantificação de DNA mitocondrial, utilizou-se 0,1 ng de DNA como modelo.

Utilizou-se um termociclador em tempo real ABI 7900HT acoplado com SYBR Green (Applied Biosystems) e os seguintes parâmetros de ciclagem: Fase 1, 50 ° C durante 2 min; Fase 2, 95 ° C durante 10 min; Estágio 3, 40 ciclos para 95 ° C para 15 s; 60 ° C durante 1 min; E estágio 4, 95 ° C durante 15 s; 60 ° C durante 15 s; 95 ° C durante 15 s.

A linearidade da curva de amplificação foi analisada utilizando o ABI 7900HT Software e o tempo médio de ciclo da parte linear da curva foi designado (CT). Cada amostra foi analisada em duplicata.

5.9 – Extração e quantificação de RNA para expressão de TFAM, NRF-1 e PGC-1 α

Amostras de aproximadamente 100 gramas de tecido hepático (lobo direito) de ratos *wistar* previamente experimentados conforme anteriormente foram coletadas *post mortem*. As amostras foram depositadas em tubos de criogenia, colocadas em nitrogênio líquido e em seguida acondicionadas em *freezer* a 80 graus celsius negativos. Em seguida, essas amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido com pistilo e cadinho de porcelana e reacondicionadas em solução de dicarbonato de dietila (DEPC), conforme descrito por Barbeiro, 2006.

Após a coleta de todas as amostras, as mesmas foram descongeladas e colocadas em solução TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e procedidas de acordo com protocolo descrito por Schmittgen e Livak, 2008. Em seguida, foi realizada a purificação da amostra e normalização das proteínas. O RT-PCR foi realizado utilizando-se o aparelho Applied Biosystems StepOnePlus® (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e SYBR® Green Master Mix, de acordo com os seguintes parâmetros: 1 ciclo às 48 °C (30 min), 1 ciclo a 95°C (10 min) e 40 ciclos a 95°C (15 s), 60° C (1 min), seguido por análise do *melt curve*. Foram calculadas a média do

threshold de cada curva (CT) e calculado a média de duas curvas para cada amostra em duplicata ($\Delta\Delta CT$).

Foram utilizados os seguintes primers: TFAM (forward 5'-AAGGGAATGGGAAAGGTAGA-3'; reverse 5'-AACAGGACATGGAAAGCAGAT-3'), NRF-1 (forward 5'-GCACCTTTGGAGAATGTGGT-3'; reverse: 5'-CTGAGCCTGGGTCATTTTGT-3') e PGC 1- α (forward ATGAGGCAAAC TGCTAGCG; reverse TGAGGACTTGCT GAGTTGTG).

5.10 – Avaliação dos complexos respiratórios I e IV

Para a avaliação do complexo respiratório I e IV foi utilizado o Complex I Rodent Enzyme Activity Microplate Assay Kit® (Abcam Plc, Cambridge, Reino Unido) e o Complex IV Rodent Enzyme Activity Microplate Assay Kit® (Abcam Plc, Cambridge, Reino Unido). As amostras foram ajustadas para uma concentração de 5mg/ml quando colocadas na Solução 1 do kit.

Em seguida, foi realizada extração protéica com detergente, seguida de centrifugação da amostra a 16000 rpm por 20 minutos. Todo o sobrenadante foi, isolado.

A normalização das proteínas do sobrenadante foram padronizadas através da técnica de Bradford e, em seguida, as amostras foram distribuídas na placa e incubada por 3 horas a 25 graus celsius.

A placa foi enxaguada com Solução 1 e foi adicionado o *Assay Solution* e a mensuração foi realizada com densidade óptica de 550nm em intervalos de 1-5 minutos durante 2 horas a 30 graus celsius.

5.11 – Análise estatística

Foram calculadas as médias, desvios padrões da média e teste comparativo ANOVA quando comparados mais duas amostras variáveis. Para a avaliação estatística dos complexos respiratórios, foi calculado o $V_{\max}$ de cada um dos grupos. Os testes foram realizados através do *software* GraphpadPrism® (GraphPad Software, Inc., California, EUA). Para efeito de significância estatística foi utilizado $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 – Padronização da técnica de indução a tolerância

A padronização da técnica de indução a tolerância faz-se necessária para verificação da eficácia da dose de LPS administrada versus a sobrevivência dos animais quando submetidos à dose letal de LPS.

A partir dos resultados, pode-se concluir que as doses utilizadas para induzir a tolerância foram satisfatórias, mostrando diferença significativa na curva de mortalidade do grupo controle e tolerante.

Gráfico 1. Curva de sobrevivência de animais controle (dose letal de 40mg/kg) e tolerantes (submetidos à dose de 2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por mais 2 dias e dose letal de 40mg/kg no dia 8). $p < 0,05$.

Gráfico 2: Curva de sobrevivência de animais controle (dose letal de 40mg/kg) e CLP Tolerante (submetidos à dose de 2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por mais 2 dias e CLP no dia 8). p<0,05.

6.2 - Função Mitocondrial

O primeiro dado analisado foi a quantificação do DNA mitocondrial a partir do método descrito na sessão anterior.

Tabela 1. Contagem do mtDNA a partir de amostras de tecido hepático. Valores expressos em média e erro padrão da média. FMUSP, São Paulo, SP, 2017

Grupo	Quantidade relativa de mtDNA
Controle	1,53 ± 0,23
Tolerante	3,66 ± 0,59
CLP	3,96 ± 0,87
CLP Tolerante	3,17 ± 0,38

Gráfico 3. Quantificação de DNA mitocondrial em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. * $p < 0,05$ vs. Controle.

A quantificação de DNA mitocondrial foi maior no grupo CLP em relação ao grupo controle. Os demais grupos permaneceram iguais. Através da quantificação da função mitocondrial, pode-se inferir que, apesar da alta quantidade de mitocôndria no tecido e a baixa razão de respiração celular, essas mitocôndrias não estão funcionais do ponto de vista de produção de ATP. Sugere-se que sejam mitocôndrias imaturas, formadas a partir da alta expressão de fatores de biogênese mitocondrial.

Após a quantificação de mtDNA, buscamos associar os fatores de biogênese mitocondrial que pudessem estar associados aos valores encontrados. Foram verificadas as expressões gênicas para NRF-1, TFAM e PGC-1 α .

Tabela 2. Avaliação da expressão dos fatores de biogênese mitocondrial NRF-1, TFAM e PGC-1 α . Valores expressos em média e erro padrão da média. FMUSP, São Paulo, SP, 2017.

Grupo	NRF-1	TFAM	PGC-1 α
Controle	1,12 $\pm$ 0,10	1,02 $\pm$ 0,06	1,20 $\pm$ 0,25
Tolerante	1,14 $\pm$ 0,08	1,24 $\pm$ 0,03	1,60 $\pm$ 0,10
CLP	1,34 $\pm$ 0,26	1,09 $\pm$ 0,04	21,34 $\pm$ 2,90
CLP Tolerante	0,80 $\pm$ 0,15	1,55 $\pm$ 0,09	8,48 $\pm$ 0,43

Gráfico 4. Expressão de NRF-1 em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. CLP.

A expressão de NRF-1 mostrou-se mais evidente em animais do grupo CLP. Estudos prévios mostram que a expressão de NRF-1 aumenta em processos inflamatórios e oxidativos, como é o caso da sepse. *Schilling* et al. demonstrou,

entretanto, que a administração de doses controladas de LPS tendem a reduzir a expressão de NRF-1, como validado em nosso estudo.

Gráfico 5. Expressão de TFAM em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. *p<0,05 vs. todos os grupos.

Gráfico 6. Expressão de TFAM em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas

(submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ vs. todos os grupos.

A expressão de PGC 1-alfa mostrou-se mais evidente em animais do grupo CLP. Estudos prévios mostram que a expressão de PGC 1-alfa aumenta em processos inflamatórios e oxidativos, como é o caso da sepse. *Singer et al.* demonstrou, entretanto, que a administração de doses controladas de LPS tendem a aumentar a expressão conforme elucidado em nosso estudo.

Para efeito de entendimento e didática, os resultados serão apresentados comparando-se os dois tempos de tratamento utilizados no experimento (4 horas) nos dois estágios da respiração mitocondrial avaliados (estágio S3 e estágio S4).

Tabela 3. Avaliação da função mitocondrial através dos estágios respiratórios e consumo de O₂ em mM. Valores expressos em média e erro padrão da média. FMUSP, São Paulo, SP, 2017.

Grupo	Estágio S3	Estágio S4	RCR
Controle	60,91 $\pm$ 5,70	17,85 $\pm$ 1,51	3,41 $\pm$ 0,08
Tolerante	53,69 $\pm$ 3,80	14,14 $\pm$ 0,49	3,79 $\pm$ 0,19
CLP	35,05 $\pm$ 3,53	12,98 $\pm$ 0,82	2,69 $\pm$ 0,20
CLP Tolerante	57,15 $\pm$ 5,74	17,45 $\pm$ 1,64	3,3 $\pm$ 0,14

Gráfico 7. Avaliação do Estágio S3 da respiração mitocondrial através de ratos Wistar controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. *p<0,05 vs. Outros grupos.

O estágio S3 da respiração mitocondrial compreende o estágio em que há consumo de oxigênio e conversão do ADP em ATP. Este estágio consiste, portanto, no estágio funcional da respiração mitocondrial. Observa-se no gráfico que o grupo CLP Tolerante 4 horas apresentou consumo de oxigênio igual ao grupo Controle e Tolerante, reforçando a hipótese de que a indução a tolerância pode melhorar a conversão de ADP em ATP e, portanto, melhorar o aporte energético da célula.

Gráfico 8: Avaliação do Estágio S4 da respiração mitocondrial através de ratos Wistar controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. *p<0,05 vs. Controle. **p<0,05 vs. CLP 4 HORAS

O estágio S4 da respiração mitocondrial compreende o estágio em que há consumo de oxigênio, porém não há conversão de ADP em ATP. Este estágio consiste, portanto, no estágio não funcional da respiração mitocondrial. Observa-se no gráfico que o grupo CLP Tolerante 4 horas apresentou consumo de oxigênio igual ao grupo Controle, sugerindo que o consumo de O₂ se manteve igual ao basal. Não houve melhora nem piora quando comparado ao grupo Controle.

Gráfico 9: Avaliação da razão do controle respiratório (RCR) da respiração mitocondrial através de ratos Wistar controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. * $p < 0,05$ vs. Outros grupos.

O RCR compreende a razão de controle do consumo de O_2 . Esta razão indica a eficácia da respiração celular, pois verifica-se a quantidade de O_2 consumido em ambos os estágios e a quantidade de síntese de ATP formada no estágio S3. Observa-se no gráfico que o grupo CLP Tolerante 4 horas apresentou razão igual ao grupo Controle, sugerindo que a fosforilação oxidativa se manteve igual ao basal. Não houve melhora nem piora quando comparado ao grupo Controle.

Gráfico 10. Avaliação do Complexo Respiratório I em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. * $p < 0,05$ vs. todos os grupos.

Gráfico 11. Avaliação do Complexo Respiratório IV em animais controle (sem nenhum insulto ou tratamento), tolerante (2mg/kg por 3 dias e 5mg/kg por 2 dias, i.p.), CLP 4 horas (submetidos ao procedimento de CLP e eutanasiados 4 horas após procedimento) e CLP 4 horas tolerante (submetidos ao tratamento com LPS como o grupo tolerante e submetidos ao procedimento de CLP no dia 8 e eutanasiados 4 horas após o procedimento). Valores expressos em média±EPM. * $p < 0,05$ vs. todos os grupos.

7. DISCUSSÃO

Na sepse, a ativação de células imunológicas e endoteliais leva a uma liberação intensa de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, aumentando a expressão da molécula de adesão e regulando positivamente o sistema complemento e sistema de coagulação. Isto leva a um aumento da permeabilidade vascular, perda de fluido para o compartimento extravascular, vasodilatação sistêmica, prejudicando a função miocárdica e, conseqüentemente, causando transtornos na microcirculação do fluxo sanguíneo, o que prejudica a perfusão tecidual e o fornecimento de oxigênio para as células (KALOGERIS et al., 2012).

Recentemente, a disfunção mitocondrial foi confirmada laboratorialmente e clinicamente (BREALEY et al., 2002) e o dano séptico foi atribuído a um déficit de fornecimento de energia secundária à depleção de ATP induzida por NO. Esta noção concorda com a presença espontânea de nitrotirosina nas mitocôndrias do fígado e do diafragma de ratos endotoxêmicos (BOCZKOWSKI et al., 1999; LISDERO et al., 2002) e com os efeitos deletérios do ONOO mitocondrial, comprometendo inclusive a contração muscular (BOCZKOWSKI et al., 1999, 2001). A principal fonte de NO na endotoxemia é a iNOS, induzida pelos efeitos das citocinas inflamatórias (BOCZKOWSKI et al., 1999; LANONE et al., 2000). Contudo, o aumento da atividade de mtNOS foi detectado por Boveris et al. (2002) em ratos endotoxêmicos. Os achados indicam que o NO citosólico ou mitocondrial induz uma alta produção de O₂, que em altas concentrações de NO leva a formação de ONOO (PODEROSO et al., 1999), que por sua vez, causa dano aos complexos mitocondriais, especialmente o complexo I. Baixas taxas de transferência de elétrons através do complexo I restringem criticamente a síntese de ATP.

A diminuição da disponibilidade de oxigênio para os tecidos combinado ao baixo teor de tensão de oxigênio arterial (hipóxia), a diminuição dos níveis de hemoglobina (hipoxia anêmica) e/ou hipoperfusão (hipóxia estagnada), inibem a produção aeróbica celular de adenosina trifosfato (ATP) (PITMAN, 2011).

Há diminuição da produção de ATP na sepse (SINGER et al., 2014) mesmo quando mantida ou aumentada a paO_2 , ocorrendo um quadro variável do consumo de oxigênio sistêmico, explicando a teoria de hipóxia citopática. Esta teoria sugere um defeito adquirido na fosforilação oxidativa (ou seja, a disfunção mitocondrial). A hipoxia citopática apresenta-se como uma explicação para a disfunção e falência de múltiplos órgãos (SOUZA et al., 2015).

7.1 - Efeito da Tolerância na função mitocondrial

Os resultados do nosso experimento mostraram que a tolerância pode desempenhar um papel na proteção da mitocôndria. No tempo estudado, houve alteração da resposta dos grupos CLP Tolerante. Em 4 horas, o RCR do grupo CLP se manteve significativamente diferente dos demais grupos, enquanto o grupo CLP Tolerante se manteve igual ao grupo Controle e Tolerante. Esse fato, per se, já indica que o grupo CLP Tolerante manteve os níveis de respiração mitocondrial iguais ao grupo Controle, mostrando que a tolerância protegeu de danos piores.

Este é o primeiro estudo a demonstrar uma proteção da função respiratória mitocondrial pela tolerância. Partindo do pressuposto que a cadeia respiratória compreende cinco complexos de proteína incorporados na membrana mitocondrial

interna (complexos I a V), em mitocôndrias danificadas, em que há uma membrana interna permeável aos prótons, a síntese de ATP é reduzida por vários fatores, inclusive pela ação reversa da ATP sintase. Sob tais circunstâncias, o ATP sintase leva ATP da matriz mitocondrial e age de maneira a hidrolisar ATP, reduzindo os níveis de ATP (COOPER, 2000).

Uma das hipóteses de mecanismo protetor se dá justamente pela via de proteção dos complexos respiratórios. Animais tolerantes caracterizam-se por apresentar inibição da produção de fator de necrose de tumor estimulada por lipopolissacarídeo, níveis de interleucina-1 e interleucina-6 alterados, ativação aumentada de ciclooxygenase-2, e inibição da ativação de MAP-quinase, e translocação de NF- κ B prejudicada (FERNANDEZ et al., 2014).

A inibição da ativação de proteínas MAP-quinase podem favorecer a diminuição da apoptose celular através da via mitocondrial. As mitocôndrias desempenham um papel chave na ativação de apoptose em células de mamíferos. A apoptose ocorre devido a liberação de proteínas a partir do espaço entre a membrana mitocondrial interna e externa que, uma vez no citosol, ativam proteases e caspases que desmantelam e sinalizam a fagocitose através de corpos celulares (SUEN, 2008).

Para tanto, os complexos respiratórios foram testados para verificar se há diferença entre a quantificação de proteínas de cada um dos grupos, a fim de elucidar ainda mais o mecanismo protetor da tolerância nos animais submetidos a CLP após indução da tolerância.

A perfusão prejudicada no início do processo séptico, devido a perdas de fluido intrínsecas e extrínsecas e diminuição da ingestão, depressão miocárdica, redistribuições microcirculatórias do fluxo sangüíneo e perda de tônus vascular, podem levar à hipoxia tecidual, ou seja, oxigênio insuficiente no nível mitocondrial para conduzir a fosforilação do ADP para ATP (SINGER, 2014). Embora as características enzimáticas particulares do Complexo IV permitam funcionar efetivamente com baixas concentrações de oxigênio em pacientes hígidos, níveis criticamente baixos podem comprometer a geração de ATP e potencialmente desencadear as vias de morte celular (SINGER et al., 2007). Nossos resultados apontam para uma maior atividade do complexo respiratório IV no grupo CLP Tolerante nos primeiros minutos, porém em seguida há uma estabilização da atividade. Apesar de não ser significante entre 15 e 30 minutos, o mecanismo protetor da tolerância pode estar correlacionado com a elevação da atividade do complexo IV pelo menos nos momentos iniciais do quadro de sepse.

Os complexos I, III e IV aparentemente podem se associar para formar uma estrutura denominada respirasoma (SCHÄGGER & PFEIFFER 2000, 2001). A perda do complexo III evita a formação de respirasoma e leva a uma redução significativa do complexo I (SCHÄGGER et al., 2004; ACÍN-PÉREZ et al., 2004). A possível implicação funcional da forma dimérica dos complexos III, IV e V e da associação dos complexos I, III e IV no respirasoma está sob investigação em vários laboratórios. A partir da descoberta das respirasomas é importante considerar que os complexos respiratórios já não devem ser analisados individualmente, pois a alteração em um deles pode alterar significativamente a atuação de outros. Dessa forma, já não dá para inferir que a diminuição da atividade do complexo I, especialmente no grupo CLP, não possa reduzir a atividade de complexos não avaliados nesse estudo. A

escolha dos complexos I e IV para avaliação se deu ao fato desses serem os principais complexos que sofrem alterações dos fatores de biogênese mitocondrial previamente descritos.

A geração de quantidades excessivas de NO, monóxido de carbono, sulfato de hidrogênio e outros ROS inibem diretamente a respiração mitocondrial e causam danos diretos à proteína mitocondrial e a outras estruturas, como a membrana lipídica (SINGER, 2014). Nós relatamos uma diminuição no complexo mitocondrial I. Singer associou a diminuição da atividade do complexo respiratório I ao grau de produção de óxido nítrico no músculo esquelético de pacientes admitidos na terapia intensiva com choque séptico e, posteriormente, em músculo e fígado em um modelo de peritonite fecal de longo prazo. Outros estudos apresentaram achados semelhantes, por exemplo, Vanasco e colaboradores. Em um artigo recente, que analisou amostras de fígado e rim *post mortem*, a histopatologia mostrou morte celular mínima porém quando verificado em microscopia eletrônica, houve lesão mitocondrial generalizada, especialmente localizada na membrana (SU, 2013).

7.2 - Desacoplamento Mitocondrial na sepse

O conceito de desacoplamento foi derivado empiricamente de observações experimentais com mitocôndrias isoladas. Ele antecede as avaliações teóricas da transdução de energia mitocondrial, que, portanto, precisava explicar o mecanismo de desacoplamento. A base para o desacoplamento reside na característica fundamental da respiração mitocondrial chamada "controle respiratório" (KHASHO et al., 2014).

Na ausência de ADP, a respiração das mitocôndrias é lenta, mas sua taxa é abruptamente aumentada após a adição de ADP. A estimulação é temporária; a taxa de respiração diminui espontaneamente e permanece lenta até que outro bolus de ADP seja adicionado à suspensão mitocondrial. Estas transições na taxa de respiração podem ser repetidas várias vezes até a suspensão mitocondrial se tornar anaeróbica ($[O_2] = 0$). O ADP adicionado foi consumido simultaneamente com a estimulação da respiração e o ATP foi acumulado na suspensão, indicando que a respiração das mitocôndrias é "acoplada" à fosforilação oxidativa do ADP (STARKOV, 1997).

Como pareceu que os nucleótidos de adenina "controlam" a taxa de respiração das mitocôndrias, o fenômeno foi denominado "controle de adenilato da respiração" ou mais geral, "controle respiratório" (KRAUSE et al., 2005). Verificou-se que a quantidade de oxigênio consumida durante esta fase de respiração acelerada foi relacionada estequiometricamente com a quantidade de ADP adicionado e também dependia da natureza do substrato respiratório oxidado. Além disso, verificou-se que Ca^{2+} e alguns produtos químicos podem competir com ADP para o controle da respiração mitocondrial, estimulando-o na ausência de ADP e aumentando a quantidade de oxigênio consumido durante a fosforilação de uma determinada quantidade de ADP ou mesmo impedindo completamente a produção de ATP, assim, "desacoplando" a fosforilação da ADP da respiração das mitocôndrias (GARLID et al., 2000).

Historicamente, o "desacoplamento da fosforilação oxidativa" ou simplesmente "desacoplamento" significou exatamente uma perda de acoplamento

entre a taxa de transporte de elétrons na cadeia respiratória (respiração) e a produção de ATP (fosforilação). Os compostos capazes de estimular o consumo de oxigênio sem um aumento concomitante da produção de ATP foram sumariamente denominados "desacopladores" (KLINBERG et al., 2001).

A teoria quimiosmótica da transdução de energia nas mitocôndrias considera o "desacoplamento clássico" como uma manifestação de "vias de dissipação de energia" que compreendem todos os mecanismos que aumentam o gasto energético não produtivo nas mitocôndrias. De acordo com a teoria quimiosmótica [1-3], a energia livre liberada após a oxidação dos substratos nas mitocôndrias é conservada transformando-a no gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) em sua membrana interna (IM). O $\Delta\mu\text{H}^+$ conduz metabolicamente "reações mitocondriais" úteis, como a síntese de ATP, mantendo a homeostase do íon ou a acumulação de metabólitos contra o gradiente de sua concentração (MITCHELL, 1961). Essas reações são catalisadas pelas proteínas que servem como "transdutores reversos", convertendo a energia livre do $\Delta\mu\text{H}^+$ em uma forma diferente do calor. No contrário, uma via de dissipação de energia (EDP) usa o $\Delta\mu\text{H}^+$ para gerar uma reação metabolicamente "fútil" produzindo calor como o único resultado, reduzindo assim a quantidade de energia armazenada no $\Delta\mu\text{H}^+$.

Os resultados também apontam para um aumento do consumo de O_2 no estágio S4 da respiração mitocondrial no grupo CLP, quando o ADP disponível foi completamente convertido em ATP. Este estágio representa o nível de repouso da respiração, ou seja, sem produção de ATP. A elevação do estágio S4 pode ser desencadeada pelo desacoplamento de membranas mitocondriais.

Num estudo prévio utilizando amostras frescas de fígado de ratos submetidos a estímulo séptico houve uma absorção de oxigênio 60% maior do que os controles, embora isso fosse marcadamente dependente do suprimento de oxigênio (5). Em outro estudo, 24 horas após injeção de *Escherichia coli* viva, a atividade isolada de fosforilação hepática mitocondrial foi melhor em todos os períodos (53). No entanto, os autores também encontraram um aumento acentuado da permeabilidade da membrana mitocondrial hepática e sugeriram a coexistência de mitocôndrias hiperfuncionais e deterioradas. Uma conclusão semelhante foi publicada por Kantrow e colaboradores, que encontrou uma diminuição significativa na respiração endógena em hepatócitos isolados, mas um aumento simultâneo de 35% no consumo de oxigênio do estado 3 em preparações isoladas de mitocôndrias hepáticas 16 horas após o início da sepse. Nossos resultados mostram que na sepse precoce, o grupo CLP apresentou queda do estágio 3 da respiração mitocondrial, enquanto os demais grupos mantiveram-se estáveis. Esse mecanismo protetor da tolerância a endotoxemia pode estar associado a maior sobrevivência dos animais já que em animais sépticos a compensação do consumo do oxigênio se dá somente 16 horas após o estímulo inicial. Outro mecanismo associado ao processo de apoptose e perda da função mitocondrial é o desacoplamento da membrana mitocondrial.

O fluxo de elétrons nas mitocôndrias pode dirigir a síntese de ATP, a ativação de cátions (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), ou a transferência de hidrogênio a partir de NADPH para o NAD^+ . As proteínas desacopladoras cortam a ligação entre a condução da reação, diminuindo a quantidade de prótons disponíveis. Nas condições em que o desacoplamento ocorre, todos os gradientes protônicos e catiônicos são abolidos. Há 20 a 30 espécies moleculares diferentes que têm em comum a propriedade de

suprimir todos os processos acoplados por um fluxo de elétrons ou através da hidrólise de ATP (LODISH et al., 2000).

Na maioria das mitocôndrias, esses prótons reentram através da ATP sintase, e a energia é usada para sintetizar ATP. No entanto, se os prótons reentram por quaisquer outros meios, as mitocôndrias são consideradas desacopladas. Até certo ponto isso acontece em todas as mitocôndrias, de maneiras não compreendidas. Há também pelo menos uma proteína cuja função é permitir prótons a reentrar as mitocôndrias sem utilizar a energia para qualquer fim. Sob estas condições, a energia é libertada na forma de calor (LODISH et al., 2000).

7.3 - Biogênese Mitochondrial

A ativação dos genes nucleares para o complexo de fosforilação oxidativa (OXPHOS) e outras proteínas mitocondriais, bem como o fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) é desencadeada pelos fatores respiratórios nucleares NRF-1 e NRF-2. Os fatores de transcrição mitocondrial direcionam a transcrição e replicação do mtDNA (JORNAYVAZ, 2010) e muitos tecidos ajustam fisiologicamente o mtDNA através da biogênese mitocondrial, afim de que novas replicações sejam feitas (MORISH et al., 2014). Nossos dados sugerem que a biogênese esteja aumentada na resposta a condições inflamatórias, incluindo a sepse e a tolerância.

Haden et al. utilizaram um modelo de peritonite em ratos para demonstrar que a disfunção orgânica e a doença clínica na sepse eram acompanhadas por diminuições na taxa metabólica e na quantidade de mitocôndrias. A recuperação da atividade metabólica e da função orgânica, acompanhada de melhora clínica, foi

precedida por um aumento da expressão de marcadores de biogênese mitocondrial tais como PGC-1, Tfam e NRF-1, tal qual ocorreu no experimento que realizamos.

O número, a estrutura e a função mitocondrial normais são regulados pela biogênese mitocondrial, um mecanismo celular que ajusta a produção de energia por síntese de novas organelas e componentes orgânicos e medeia interações entre as organelas (VEGA et al., 2015). Como o genoma mitocondrial codifica apenas uma fração das proteínas mitocondriais, a biogênese mitocondrial requer comunicação entre mitocôndrias e o núcleo da célula. Por exemplo, os genes nucleares para o complexo de fosforilação oxidativa (OXPHOS) e outras proteínas mitocondriais, bem como o fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) e o fator de transcrição mitocondrial B, são ativados pelo fator respiratório nuclear NRF-1 e NRF-2. Os fatores de transcrição mitocondrial então direcionam a transcrição e a replicação de mtDNA (YASUKAWA et al., 2015). Muitos tecidos ajustam a massa mitocondrial e o conteúdo de mtDNA celular fisiologicamente através da biogênese mitocondrial (KOCH et al., 2013). Ensaios laboratoriais sugerem um papel para a biogênese na resposta a doenças inflamatórias, incluindo a sepse (YASUKAWA et al., 2006). Ratos submetidos a ligadura cecal e punção também exibiram diminuição da massa mitocondrial hepática em associação com níveis aumentados de proteína Tfam e PGC-1a. Em experimentos com ratos geneticamente modificados desafiados com *Escherichia coli* inativadas pelo calor, depleção e recuperação de mtDNA hepática dependiam da imunidade inata através do receptor Toll-like (TLR)-4 (MIRALLES, 2014). A resposta imune inata é, portanto, uma causa importante de dano oxidativo mitocondrial, bem como um fator crítico na recuperação mitocondrial. Essas investigações fornecem evidências preliminares que ligam a lesão oxidativa mitocondrial induzida por septicemia à biogênese.

Singer et al. demonstraram a ativação da biogênese mitocondrial (demonstrados pelos níveis de transcrição de PGC-1 α , NRF-1 e TFAM) que precederam a recuperação da função mitocondrial, taxa metabólica e a função fisiológica e bioquímica de alguns órgãos. O exercício e a exposição à endotoxina ativam a PGC-1 α por fosforilação da proteína. Esta modificação aumenta a estabilidade da proteína PGC-1 α , promove a sua translocação nuclear e precede aumentos na sua abundância através do mRNA (CARRÉ et al., 2010). Nosso estudo verificou que os níveis de TFAM e NRF-1 também aumentam em animais submetidos à tolerância, o que explica a maior taxa de mtDNA nos tecidos avaliados. O grupo CLP Tolerante manteve a função mitocondrial demonstrada pelo RCR igual ao grupo Controle possivelmente devido à maior disponibilidade de mtDNA e mitocôndrias funcionais no tecido hepático.

Num estudo prévio os pacientes que morreram de sepse grave apresentaram diminuição do conteúdo de ATP muscular, enquanto níveis mais elevados de ATP foram observados em sobreviventes. A disfunção orgânica e a doença clínica foram acompanhadas de diminuição da taxa metabólica e da massa mitocondrial (PIANTADOSI et al., 2007). No entanto, a recuperação da atividade metabólica e a função orgânica são possíveis e foram fortemente reguladas pela expressão de marcadores de biogênese mitocondrial, como PRARgamma-coactivator-1 α (PGC-1 α), fatores respiratórios nucleares 1 e 2 (NRF-1 e -2), e através da repressão da proteína de interação do receptor nuclear de supressores de biogênese 140 (RIP140) (CHEN et al., 2012). Além disso, os estudos pré-clínicos mais recentes e nossos resultados indicaram que não apenas a preservação, mas também a biogênese

mitocondrial é um passo essencial no restabelecimento da homeostase do órgão imune ou de tecido durante a recuperação da sepse (TOBE, 2013).

A tolerância aumentou a quantidade de mitocôndrias nas células hepáticas, contudo a sepse também induziu um aumento de mitocôndrias. Por outro lado, a respiração mitocondrial avaliada pelos S3, S4 e RCR mostraram um comprometimento durante a sepse, com desacoplamento. A indução de tolerância foi efetiva em manter a respiração e o RCR durante a sepse. Tomados em conjunto estes dados podemos avaliar que a tolerância produz um aumento de mitocôndrias funcionais, contudo, a sepse aumenta a produção de mitocôndrias que não são funcionais.

Publicações recentes sugerem que os níveis de DNA mitocondrial celular (mtDNA) estão diminuídos (PYLE et al., 2016) e os níveis circulantes de mtDNA em células estão aumentados em resposta a estímulos como trauma (ZHANG et al., 2010) e infecção bacteriana (LU et al., 2010). Além disso, o mtDNA atua como um padrão molecular associado ao dano (KRYSKO et al., 2011) que pode gerar processos moleculares, levando a respostas inflamatórias e lesões de órgãos. Com base nestes achados, Nakahira et al. concluiu que os níveis circulantes de mtDNA estariam associados à mortalidade em pacientes com UTI. Observações recentes mostram que o mtDNA contribui para a ativação do inflamasoma, um grande complexo multimolecular que controla a enzima proteolítica caspase-1 (DAVIS et al., 2011). A ativação da inflamação é exclusivamente responsável pela maturação e secreção de IL-1 β e IL-18 mediada por caspase-1 e secreção em células imunes e os níveis circulantes de IL-1 β e IL-18 estão aumentados em pacientes críticos e sépticos (MAKABE et al., 2012).

A disfunção mitocondrial tem sido descrita como um mecanismo causador de redução da atividade de células imunes na sepse. Vários estudos demonstraram redução da atividade respiratória mitocondrial de células imunitárias do sangue periférico nos estágios iniciais de pacientes sépticos admitidos na UTI (COSSARIZZA et al., 2003). Os resultados são, no entanto, um pouco divergentes, provavelmente refletindo diferenças na população estudada, sítio experimental e quais marcadores específicos de mitocôndrias foram escolhidos para a avaliação da respiração. A evolução da função respiratória mitocondrial em células imunes nos estágios posteriores da sepse ainda é amplamente desconhecida. Além disso, fica claro a partir de vários estudos que a sepse induz uma resposta de biogênese em que a massa, o número e/ou a função mitocondrial aumentam após a fase inicial do evento séptico (NAKAHIRA et al., 2011).

Nossos resultados apontaram que a quantidade de mtDNA está aumentado já nas primeiras horas após o estímulo da sepse. A expressão de PGC-1alfa também foi significativamente diferente no grupo CLP reiterando o fato de que esse é um dos principais promotores da biogênese mitocondrial. O grupo CLP Tolerante mostrou-se estatisticamente diferente dos grupos Controle e Tolerante. Pode-se inferir que a tendência é que haja um aumento do número de mitocôndrias nas horas subsequentes após o estímulo séptico do animal tolerante. Os níveis de PGC-1alfa diminutos em relação ao grupo CLP se deve ao fato de que o processo inflamatório, imperativo para o aumento da expressão do mesmo, apresenta-se diminuído em animais que passaram pelo processo de tolerância, conforme já estudado em nosso laboratório.

Estudos subsequentes auxiliarão a elucidar o mecanismo de tolerância associada a função mitocondrial buscando novas vertentes para o entendimento da fisiopatologia da síndrome séptica. Os resultados encontrados no nosso grupo de estudo deram início a uma nova fase da experimentação que objetiva reduzir a mortalidade das unidades de terapia intensiva decorrentes dos inúmeros casos de sepse.

8. CONCLUSÃO

A tolerância ao lipopolissacarídeo manteve as mesmas quantidades de mtDNA em hepatócitos, porém quando avaliada a função mitocondrial, as mesmas se mostraram mais eficazes quando avaliado o consumo de oxigênio. Em relação aos complexos respiratórios, o complexo I se manteve menos ativo no grupo CLP e não houve diferença estatística entre os grupos controle e CLP tolerante, concluindo que um dos mecanismos de proteção da tolerância está na manutenção da atividade desse complexo.

Pode-se concluir, portanto, que uma das formas de proteção que se induz com a tolerância se dá através da manutenção da função mitocondrial.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acín-Pérez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernández-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Pérez-Martos A, Bruno C, et al. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell*. 2004;13(6):805-15.
2. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002. xxxiv, 1463, 86 p. p.
3. Alvarez S, Boveris A. Mitochondrial nitric oxide metabolism in rat muscle during endotoxemia. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(9):1472-8.
4. Alvarez S, Vico T, Vanasco V. Cardiac dysfunction, mitochondrial architecture, energy production, and inflammatory pathways: Interrelated aspects in endotoxemia and sepsis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;81(Pt B):307-14.
5. Angell JE, Lindner DJ, Shapiro PS, Hofmann ER, Kalvakolanu DV. Identification of GRIM-19, a novel cell death-regulatory gene induced by the interferon-beta and retinoic acid combination, using a genetic approach. *J Biol Chem*. 2000;275(43):33416-26.
6. Arulkumaran N, Deutschman CS, Pinsky MR, Zuckerbraun B, Schumacker PT, Gomez H, et al. MITOCHONDRIAL FUNCTION IN SEPSIS. *Shock*. 2016;45(3):271-81.
7. Azevedo LC. Mitochondrial dysfunction during sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2010;10(3):214-23.
8. Azevedo LC. Mitochondrial dysfunction during sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2010;10(3):214-23.
9. Azevedo LC. Sepsis pathogenesis: how many pieces are there in the puzzle? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2010;10(3):188-9.
10. Bajčetić M, Spasić S, Spasojević I. Redox therapy in neonatal sepsis: reasons, targets, strategy, and agents. *Shock*. 2014;42(3):179-84.
11. Bar-Or D, Carrick MM, Mains CW, Rael LT, Slone D, Brody EN. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: Are there clues to better treatment? *Redox Rep*. 2015;20(5):193-7.
12. Bartz RR, Fu P, Suliman HB, Crowley SD, MacGarvey NC, Welty-Wolf K, et al. *Staphylococcus aureus* sepsis induces early renal mitochondrial DNA repair and mitochondrial biogenesis in mice. *PLoS One*. 2014;9(7):e100912.
13. Bayir H, Kagan VE. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care*. 2008;12(1):206.
14. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman; 2002.

15. Bleier L, Dröse S. Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1827(11-12):1320-31.
16. Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Carreras MC, Aubier M, Poderoso JJ. Peroxynitrite-mediated mitochondrial dysfunction. *Biol Signals Recept*. 2001;10(1-2):66-80.
17. Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Carreras MC, Aubier M, Poderoso JJ. Peroxynitrite-mediated mitochondrial dysfunction. *Biol Signals Recept*. 2001;10(1-2):66-80.
18. Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris A, et al. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J*. 1999;13(12):1637-46.
19. Boveris A, Alvarez S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(9):1186-93.
20. Boyapati RK, Ho GT, Satsangi J. Can Thiopurines Prevent Formation of Antibodies Against Tumor Necrosis Factor Antagonists After Failure of These Therapies? *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(1):76-8.
21. Bozza FA, D'Avila JC, Ritter C, Sonnevile R, Sharshar T, Dal-Pizzol F. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock*. 2013;39 Suppl 1:10-6.
22. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(3):R491-7.
23. Brealey D, Singer M. Mitochondrial Dysfunction in Sepsis. *Curr Infect Dis Rep*. 2003;5(5):365-71.
24. Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, et al. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab*. 2005;1(6):409-14.
25. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):222-30.
26. Carré JE, Orban JC, Re L, Felsmann K, Iffert W, Bauer M, et al. Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(6):745-51.
27. Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med*. 2004;25(1-2):125-39.
28. Chen HW, Kuo HT, Lu TS, Wang SJ, Yang RC. Cytochrome c oxidase as the target of the heat shock protective effect in septic liver. *Int J Exp Pathol*. 2004;85(5):249-56.

29. Chen X, Shen YY, Zhang YP. [Review of mtDNA in molecular evolution studies]. *Dongwuxue Yanjiu*. 2012;33(6):566-73.
30. Chen Y, Wang Y, Chen J, Chen X, Cao W, Chen S, et al. Roles of transcriptional corepressor RIP140 and coactivator PGC-1 α in energy state of chronically infarcted rat hearts and mitochondrial function of cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;362(1-2):11-8.
31. Chial HJ, Wu R, Ustach CV, McPhail LC, Mobley WC, Chen YQ. Membrane targeting by APPL1 and APPL2: dynamic scaffolds that oligomerize and bind phosphoinositides. *Traffic*. 2008;9(2):215-29.
32. Chowanadisai W, Bauerly KA, Tchapanian E, Wong A, Cortopassi GA, Rucker RB. Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1 α expression. *J Biol Chem*. 2010;285(1):142-52.
33. Cimolai MC, Alvarez S, Bode C, Bugger H. Mitochondrial Mechanisms in Septic Cardiomyopathy. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):17763-78.
34. Cinel I, Opal SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med*. 2009;37(1):291-304.
35. Comim CM, Rezin GT, Scaini G, Di-Pietro PB, Cardoso MR, Petronilho FC, et al. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion*. 2008;8(4):313-8.
36. Cooper CE, Davies NA. Effects of nitric oxide and peroxynitrite on the cytochrome oxidase K(m) for oxygen: implications for mitochondrial pathology. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1459(2-3):390-6.
37. Cossarizza A. Tests for mitochondrial function and DNA: potentials and pitfalls. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16(1):5-10.
38. Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*. 2006;27(8):352-7.
39. Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion*. 2004;4(5-6):729-41.
40. Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion*. 2004;4(5-6):729-41.
41. Crouser ED. Respiratory failure during critical illness: are mitochondria to blame? *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(7):793-4.
42. Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Mandich DV, Green-Church KB. A proteomic analysis of liver mitochondria during acute endotoxemia. *Intensive Care Med*. 2006;32(8):1252-62.

43. Crouser E, Exline M, Knoell D, Wewers MD. Sepsis: links between pathogen sensing and organ damage. *Curr Pharm Des.* 2008;14(19):1840-52.
44. Crouser E, Exline M, Knoell D, Wewers MD. Sepsis: links between pathogen sensing and organ damage. *Curr Pharm Des.* 2008;14(19):1840-52.
45. d'Avila JC, Santiago AP, Amâncio RT, Galina A, Oliveira MF, Bozza FA. Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. *Crit Care Med.* 2008;36(6):1925-32.
46. Davies NA, Cooper CE, Stidwill R, Singer M. Inhibition of mitochondrial respiration during early stage sepsis. *Adv Exp Med Biol.* 2003;530:725-36.
47. Davis RL, Sue CM. The genetics of mitochondrial disease. *Semin Neurol.* 2011;31(5):519-30.
48. De Kock I, Van Daele C, Poelaert J. Sepsis and septic shock: pathophysiological and cardiovascular background as basis for therapy. *Acta Clin Belg.* 2010;65(5):323-9.
49. Diaz F, Garcia S, Hernandez D, Regev A, Rebelo A, Oca-Cossio J, et al. Pathophysiology and fate of hepatocytes in a mouse model of mitochondrial hepatopathies. *Gut.* 2008;57(2):232-42.
50. Drosatos K, Khan RS, Trent CM, Jiang H, Son NH, Blaner WS, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation prevents sepsis-related cardiac dysfunction and mortality in mice. *Circ Heart Fail.* 2013;6(3):550-62.
51. Dröse S. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1827(5):578-87.
52. Duran-Bedolla J, Montes de Oca-Sandoval MA, Saldaña-Navor V, Villalobos-Silva JA, Rodriguez MC, Rivas-Arancibia S. Sepsis, mitochondrial failure and multiple organ dysfunction. *Clin Invest Med.* 2014;37(2):E58-69.
53. Evans MJ, Scarpulla RC. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev.* 1990;4(6):1023-34.
54. Exline MC, Crouser ED. Mitochondrial mechanisms of sepsis-induced organ failure. *Front Biosci.* 2008;13:5030-41.
55. Exline MC, Crouser ED. Mitochondrial mechanisms of sepsis-induced organ failure. *Front Biosci.* 2008;13:5030-41.
56. Exline MC, Crouser ED. Mitochondrial dysfunction during sepsis: still more questions than answers. *Crit Care Med.* 2011;39(5):1216-7.
57. Fearnley IM, Carroll J, Shannon RJ, Runswick MJ, Walker JE, Hirst J. GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem.* 2001;276(42):38345-8.

58. Fink BD, Hong YS, Mathahs MM, Scholz TD, Dillon JS, Sivitz WI. UCP2-dependent proton leak in isolated mammalian mitochondria. *J Biol Chem*. 2002;277(6):3918-25.
59. Fink M. Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1997;110:87-95.
60. Fink MP. Cytopathic hypoxia in sepsis: a true problem? *Minerva Anesthesiol*. 2001;67(4):290-1.
61. Fink MP. Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin*. 2001;17(1):219-37.
62. Fredriksson K, Rooyackers O. Mitochondrial function in sepsis: respiratory versus leg muscle. *Crit Care Med*. 2007;35(9 Suppl):S449-53.
63. Fullerton JN, Singer M. Organ failure in the ICU: cellular alterations. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(5):581-6.
64. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*. 2011;107(1):57-64.
65. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*. 2011;107(1):57-64.
66. Garcia J, Han D, Sancheti H, Yap LP, Kaplowitz N, Cadenas E. Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates. *J Biol Chem*. 2010;285(51):39646-54.
67. Gardner PR. Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. *Biosci Rep*. 1997;17(1):33-42.
68. Garlid KD, Jabůrek M, Jezek P, Varecha M. How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim Biophys Acta*. 2000;1459(2-3):383-9.
69. Garrabou G, Morén C, López S, Tobías E, Cardellach F, Miró O, et al. The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis*. 2012;205(3):392-400.
70. Geller ER, Kirkpatrick JR. Cellular metabolism in sepsis: effects of nutritional therapy. *Curr Surg*. 1986;43(5):406-9.
71. Gellerich FN, Trumbeckaite S, Opalka JR, Gellerich JF, Chen Y, Neuhofer C, et al. Mitochondrial dysfunction in sepsis: evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. *Biosci Rep*. 2002;22(1):99-113.
72. Gong P, Li CS. [Sepsis and mitochondrial dysfunction]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2013;25(4):254-6.
73. Haden DW, Suliman HB, Carraway MS, Welty-Wolf KE, Ali AS, Shitara H, et al. Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(8):768-77.

74. Han D, Kaplowitz N. Mitochondria in liver disease. Boca Raton: CRC Press; 2016. xxv, 485 pages, 20 unnumbered pages of plates p.
75. Harrington JS, Choi AMK, Nakahira K. Mitochondrial DNA in Sepsis. *Curr Opin Crit Care*. 2017;23(4):284-90.
76. Harrois A, Huet O, Duranteau J. Alterations of mitochondrial function in sepsis and critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2009;22(2):143-9.
77. Hüttemann M, Lee I, Samavati L, Yu H, Doan JW. Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(12):1701-20.
78. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005;9 Suppl 4:S13-9.
79. Ince C, Mik EG. Microcirculatory and mitochondrial hypoxia in sepsis, shock, and resuscitation. *J Appl Physiol* (1985). 2016;120(2):226-35.
80. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
81. Jeger V, Djafarzadeh S, Jakob SM, Takala J. Mitochondrial function in sepsis. *Eur J Clin Invest*. 2013;43(5):532-42.
82. Jones C, Badger SA, Black JM, McFerran NV, Hoper M, Diamond T, et al. The use of antiendotoxin peptides in obstructive jaundice endotoxemia. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012;24(3):248-54.
83. Jones SM, Steele RW. Recurrent group B streptococcal bacteremia. *Clin Pediatr (Phila)*. 2012;51(9):884-7.
84. Jorge MA, Irrazábal CL. [Pathophysiology of shock. New perspectives]. *Medicina (B Aires)*. 2011;71(5):469-76.
85. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*. 2010;47:69-84.
86. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317.
87. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317.
88. Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys*. 1997;345(2):278-88.
89. Kaplowitz N, DeLeve LD. Drug-induced liver disease. Third edition. ed. Amsterdam: Academic Press; 2013. xxiv, 746 pages, 10 pages of plates p.

90. Kawai T, Akira S. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem.* 2007;141(2):137-45.
91. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 2004;18(4):357-68.
92. Khacho M, Tarabay M, Patten D, Khacho P, MacLaurin JG, Guadagno J, et al. Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival. *Nat Commun.* 2014;5:3550.
93. Koch L. Neuroendocrinology: Mitofusins and energy balance. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(12):691.
94. Krause F, Reifschneider NH, Goto S, Dencher NA. Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329(2):583-90.
95. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, et al. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 2011;32(4):157-64.
96. Krysko DV, Roels F, Leybaert L, D'Herde K. Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 2001;49(10):1277-84.
97. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* 2015;13:89.
98. Kula R, Chýlek V, Szturz P, Tichý J, Sklienka P. [Pathogenesis of severe sepsis--from macrocirculation to mitochondria]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2006;12(4):143-9.
99. Kumaran RS, Choi YK, Singh V, Kim KJ, Kim HJ. Cytotoxic Effects of ZnO Nanoparticles on the Expression of ROS-Responsive Genes in the Human Cell Lines. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016;16(1):210-8.
100. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med.* 2001;345(8):588-95.
101. Ledderose C, Bao Y, Ledderose S, Woehrle T, Heinisch M, Yip L, et al. Mitochondrial Dysfunction, Depleted Purinergic Signaling, and Defective T Cell Vigilance and Immune Defense. *J Infect Dis.* 2016;213(3):456-64.
102. Lee SJ, Zhang J, Choi AM, Kim HP. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:327167.
103. Lehninger AL. The mitochondrion; molecular basis of structure and function. New York,: Benjamin; 1964. xx, 263 p. p.
104. Leite HP, de Lima LF. Metabolic resuscitation in sepsis: a necessary step beyond the hemodynamic? *J Thorac Dis.* 2016;8(7):E552-7.

105. Lenaz G, Baracca A, Barbero G, Bergamini C, Dalmonte ME, Del Sole M, et al. Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6-7):633-40.
106. Leverve XM. Mitochondrial function and substrate availability. *Crit Care Med*. 2007;35(9 Suppl):S454-60.
107. Leverve X, Mustafa I, Novak I, Krouzecky A, Rokyta R, Matejovic M, et al. Lactate metabolism in acute uremia. *J Ren Nutr*. 2005;15(1):58-62.
108. Levy RJ. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Shock*. 2007;28(1):24-8.
109. Levy RJ, Deutschman CS. Cytochrome c oxidase dysfunction in sepsis. *Crit Care Med*. 2007;35(9 Suppl):S468-75.
110. Lewis AJ, Billiar TR, Rosengart MR. Biology and Metabolism of Sepsis: Innate Immunity, Bioenergetics, and Autophagy. *Surg Infect (Larchmt)*. 2016;17(3):286-93.
111. Li L, Ma T, Hu WQ, Han L, Wang Z. [Study on mechanisms of mitochondria in lymphocyte apoptosis of sepsis]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2010;48(16):1243-6.
112. Lisdero CL, Carreras MC, Meulemans A, Melani M, Aubier M, Boczkowski J, et al. The mitochondrial interplay of ubiquinol and nitric oxide in endotoxemia. *Methods Enzymol*. 2004;382:67-81.
113. Llesuy S, Evelson P, González-Flecha B, Peralta J, Carreras MC, Poderoso JJ, et al. Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Radic Biol Med*. 1994;16(4):445-51.
114. Llimona F, de Lima TM, Moretti AI, Theobaldo M, Jukemura J, Velasco IT, et al. PGC-1 α expression is increased in leukocytes in experimental acute pancreatitis. *Inflammation*. 2014;37(4):1231-9.
115. Lodish HF. *Molecular cell biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman; 2000. xxxvi, 1084, G-17, I-36 p. p.
116. Lorente L, Martín MM, López-Gallardo E, Blanquer J, Solé-Violán J, Labarta L, et al. Decrease of oxidative phosphorylation system function in severe septic patients. *J Crit Care*. 2015;30(5):935-9.
117. Losser MR, Payen D. Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis*. 1996;16(4):357-67.
118. Lu G, Haider HKh, Porollo A, Ashraf M. Mitochondria-specific transgenic overexpression of connexin-43 simulates preconditioning-induced cytoprotection of stem cells. *Cardiovasc Res*. 2010;88(2):277-86.
119. Lush CW, Kvietys PR. Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation*. 2000;7(2):83-101.

120. MacGarvey NC, Suliman HB, Bartz RR, Fu P, Withers CM, Welty-Wolf KE, et al. Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(8):851-61.
121. Machado MC, Coelho AM, Martins JO, Sampietre SN, Molan NA, Patzina RA, et al. CO₂ abdominal insufflation decreases local and systemic inflammatory response in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2010;39(2):175-81.
122. Maciel EA, Athanazio DA, Reis EA, Cunha FQ, Queiroz A, Almeida D, et al. High serum nitric oxide levels in patients with severe leptospirosis. *Acta Trop*. 2006;100(3):256-60.
123. Magner M, Szentiványi K, Svandová I, Ješina P, Tesařová M, Honzík T, et al. Elevated CSF-lactate is a reliable marker of mitochondrial disorders in children even after brief seizures. *Eur J Paediatr Neurol*. 2011;15(2):101-8.
124. Makabe H, Kojika M, Takahashi G, Matsumoto N, Shibata S, Suzuki Y, et al. Interleukin-18 levels reflect the long-term prognosis of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *J Anesth*. 2012;26(5):658-63.
125. Mayevsky A, Chance B. Oxidation-reduction states of NADH in vivo: from animals to clinical use. *Mitochondrion*. 2007;7(5):330-9.
126. Medzhitov R. Septic shock: on the importance of being tolerant. *Immunity*. 2013;39(5):799-800.
127. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002;296(5566):298-300.
128. Melo ES, Barbeiro HV, Ariga S, Goloubkova T, Curi R, Velasco IT, et al. Immune cells and oxidative stress in the endotoxin tolerance mouse model. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(1):57-67.
129. Melo ES, Goloubkova T, Barbeiro DF, Gorjão R, Vasconcelos D, Szabo C, et al. Endotoxin tolerance: selective alterations in gene expression and protection against lymphocyte death. *Immunobiology*. 2010;215(6):435-42.
130. Melo ES, Goloubkova T, Barbeiro DF, Gorjão R, Vasconcelos D, Szabo C, et al. Endotoxin tolerance: selective alterations in gene expression and protection against lymphocyte death. *Immunobiology*. 2010;215(6):435-42.
131. Merz TM, Pereira AJ, Schürch R, Schefold JC, Jakob SM, Takala J, et al. Mitochondrial function of immune cells in septic shock: A prospective observational cohort study. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178946.
132. Mitchell JR, Potter WZ. Drug metabolism in the production of liver injury. *Med Clin North Am*. 1975;59(4):877-85.
133. Mofarrahi M, Sigala I, Guo Y, Godin R, Davis EC, Petrof B, et al. Autophagy and skeletal muscles in sepsis. *PLoS One*. 2012;7(10):e47265.

134. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):240-73, Table of Contents.
135. Moreno-Sánchez R, Hernández-Esquivel L, Rivero-Segura NA, Marín-Hernández A, Neuzil J, Ralph SJ, et al. Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II--evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I. *FEBS J.* 2013;280(3):927-38.
136. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004;279(47):49064-73.
137. Muravchick S, Levy RJ. Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology.* 2006;105(4):819-37.
138. Nakahira K, Cloonan SM, Mizumura K, Choi AM, Ryter SW. Autophagy: a crucial moderator of redox balance, inflammation, and apoptosis in lung disease. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(3):474-94.
139. Opitz B. Inflammasome Deficiency Makes Pro-resolving Lipid Mediators Great Again. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(6):668-9.
140. Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttrop N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost.* 2009;102(6):1103-9.
141. Palmisano G, Sardanelli AM, Signorile A, Papa S, Larsen MR. The phosphorylation pattern of bovine heart complex I subunits. *Proteomics.* 2007;7(10):1575-83.
142. Papa S, Scacco S, Schliebs M, Trappe J, Seibel P. Mitochondrial diseases and aging. *Mol Aspects Med.* 1996;17(6):513-63.
143. Parikh SM, Yang Y, He L, Tang C, Zhan M, Dong Z. Mitochondrial function and disturbances in the septic kidney. *Semin Nephrol.* 2015;35(1):108-19.
144. Park DW, Zmijewski JW. Mitochondrial Dysfunction and Immune Cell Metabolism in Sepsis. *Infect Chemother.* 2017;49(1):10-21.
145. Patil NK, Parajuli N, MacMillan-Crow LA, Mayeux PR. Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis: mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;306(7):F734-43.
146. Peruchi BB, Petronilho F, Rojas HA, Constantino L, Mina F, Vuolo F, et al. Skeletal muscle electron transport chain dysfunction after sepsis in rats. *J Surg Res.* 2011;167(2):e333-8.
147. Piantadosi CA, Carraway MS, Haden DW, Suliman HB. Protecting the permeability pore and mitochondrial biogenesis. *Novartis Found Symp.* 2007;280:266-76; discussion 76-80.

148. Pinsky MR. Pathophysiology of sepsis and multiple organ failure: pro- versus anti-inflammatory aspects. *Contrib Nephrol.* 2004;144:31-43.
149. Pinsky MR. Sepsis and multiple organ failure. *Contrib Nephrol.* 2007;156:47-63.
150. Poderoso JJ, Fernandez S, Carreras MC, Tchercanski D, Acevedo C, Rubio M, et al. Liver oxygen uptake dependence and mitochondrial function in septic rats. *Circ Shock.* 1994;44(4):175-82.
151. Poderoso JJ, Lisdero C, Schöpfer F, Riobó N, Carreras MC, Cadenas E, et al. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol Chem.* 1999;274(53):37709-16.
152. Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, et al. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis.* 1998;24(3):340-55.
153. Potocka A, Zimowski J. Metabolism of conjugated sterols in eggplant. Part 1. UDP-glucose : sterol glucosyltransferase. *Acta Biochim Pol.* 2008;55(1):127-34.
154. Power C, Fanning N, Redmond HP. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock.* 2002;18(3):197-211.
155. Prasai K. Regulation of mitochondrial structure and function by protein import: A current review. *Pathophysiology.* 2017;24(3):107-22.
156. Protti A, Carré J, Frost MT, Taylor V, Stidwill R, Rudiger A, et al. Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. *Crit Care Med.* 2007;35(9):2150-5.
157. Protti A, Fortunato F, Caspani ML, Pluderi M, Lucchini V, Grimoldi N, et al. Mitochondrial changes in platelets are not related to those in skeletal muscle during human septic shock. *PLoS One.* 2014;9(5):e96205.
158. Puigserver P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1- α . *Int J Obes (Lond).* 2005;29 Suppl 1:S5-9.
159. Puigserver P, Herron D, Gianotti M, Palou A, Cannon B, Nedergaard J. Induction and degradation of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes in vitro and in vivo. Evidence for a rapidly degradable pool. *Biochem J.* 1992;284 (Pt 2):393-8.
160. Puigserver P, Palou A, Gianotti M. Dietary regulation of fasting-induced mitochondrial protein degradation in adult rat brown adipose tissue. *Biochem Int.* 1992;27(6):1037-46.
161. Pyle A, Anugrha H, Kurzawa-Akanbi M, Yarnall A, Burn D, Hudson G. Reduced mitochondrial DNA copy number is a biomarker of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2016;38:216.e7-.e10.

162. Quinlan CL, Perevoschikova IV, Goncalves RL, Hey-Mogensen M, Brand MD. The determination and analysis of site-specific rates of mitochondrial reactive oxygen species production. *Methods Enzymol.* 2013;526:189-217.
163. Rios EC, de Lima TM, Moretti AI, Soriano FG. The role of nitric oxide in the epigenetic regulation of THP-1 induced by lipopolysaccharide. *Life Sci.* 2016;147:110-6.
164. Rocha M, Herance R, Rovira S, Hernández-Mijares A, Victor VM. Mitochondrial dysfunction and antioxidant therapy in sepsis. *Infect Disord Drug Targets.* 2012;12(2):161-78.
165. Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med.* 2007;35(6):1599-608.
166. Rudiger A, Stotz M, Singer M. Cellular processes in sepsis. *Swiss Med Wkly.* 2008;138(43-44):629-34.
167. Ruggieri AJ, Levy RJ, Deutschman CS. Mitochondrial dysfunction and resuscitation in sepsis. *Crit Care Clin.* 2010;26(3):567-75, x-xi.
168. Russell JA, Walley KR. Update in sepsis 2012. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(12):1303-7.
169. Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE, et al. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ Res.* 2004;94(4):525-33.
170. Rustin P. Mitochondria, from cell death to proliferation. *Nat Genet.* 2002;30(4):352-3.
171. Sakaguchi S. [Metabolic aspects of endotoxin as a model of septic shock--approached from oxidative stress]. *Yakugaku Zasshi.* 2004;124(2):69-87.
172. Sayeed MM. Mitochondrial dysfunction in sepsis: a familiar song with new lyrics. *Crit Care Med.* 2002;30(12):2780-1.
173. Scarpulla RC. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1819(9-10):1088-97.
174. Schägger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, Brandt U. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 2004;279(35):36349-53.
175. Schägger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 2000;19(8):1777-83.
176. Singer M. Metabolic failure. *Crit Care Med.* 2005;33(12 Suppl):S539-42.

177. Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Crit Care Med.* 2007;35(9 Suppl):S441-8.
178. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence.* 2014;5(1):66-72.
179. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence.* 2014;5(1):66-72.
180. Singer M, Brealey D. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Biochem Soc Symp.* 1999;66:149-66.
181. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet.* 2004;364(9433):545-8.
182. Singer M, Glynn P. Treating critical illness: the importance of first doing no harm. *PLoS Med.* 2005;2(6):e167.
183. Sjövall F, Ehinger JK, Marelsson SE, Morota S, Frostner EA, Uchino H, et al. Mitochondrial respiration in human viable platelets--methodology and influence of gender, age and storage. *Mitochondrion.* 2013;13(1):7-14.
184. Skulachev VP. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med.* 1999;20(3):139-84.
185. Sousa MI, Rodrigues AS, Pereira S, Perestrelo T, Correia M, Ramalho-Santos J. Mitochondrial Mechanisms of Metabolic Reprogramming in Proliferating Cells. *Curr Med Chem.* 2015;22(20):2493-504.
186. Spasojević I, Obradović B, Spasić S. Bench-to-bedside review: Neonatal sepsis--redox processes in pathogenesis. *Crit Care.* 2012;16(3):221.
187. Stains CI, Tedford NC, Walkup TC, Luković E, Goguen BN, Griffith LG, et al. Interrogating signaling nodes involved in cellular transformations using kinase activity probes. *Chem Biol.* 2012;19(2):210-7.
188. Stallons LJ, Funk JA, Schnellmann RG. Mitochondrial Homeostasis in Acute Organ Failure. *Curr Pathobiol Rep.* 2013;1(3).
189. Starkov AA. "Mild" uncoupling of mitochondria. *Biosci Rep.* 1997;17(3):273-9.
190. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:19-48.
191. Stolf AM, Lívero FoR, Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Fabosi IA, Alves de Souza CE, et al. Effects of statins on liver cell function and inflammation in septic rats. *J Surg Res.* 2012;178(2):888-97.

192. Su M, Dhoopun AR, Yuan Y, Huang S, Zhu C, Ding G, et al. Mitochondrial dysfunction is an early event in aldosterone-induced podocyte injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(4):F520-31.
193. Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev*. 2008;22(12):1577-90.
194. Svistunenko DA, Davies N, Brealey D, Singer M, Cooper CE. Mitochondrial dysfunction in patients with severe sepsis: an EPR interrogation of individual respiratory chain components. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(4):262-72.
195. Takahashi E, Asano K. Mitochondrial respiratory control can compensate for intracellular O₂ gradients in cardiomyocytes at low PO₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(3):H871-8.
196. Takahashi I, Ohnoshi T, Kohi F, Ohmoto E, Inagaki N. Superoxide anion (O₂⁻) production by neutrophils in leukemia and related diseases. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi*. 1983;46(7):1497-505.
197. Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, et al. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(5):509-17.
198. Tao P, Yin H, Ma Y. [Study of the mechanisms of curcumin on mitochondrial permeability transition of hepatocytes in rats with sepsis]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2014;26(9):666-70.
199. Taylor DE, Kantrow SP, Piantadosi CA. Mitochondrial respiration after sepsis and prolonged hypoxia. *Am J Physiol*. 1998;275(1 Pt 1):L139-44.
200. Tobe EH. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and major depressive disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:567-73.
201. Tran M, Parikh SM. Mitochondrial biogenesis in the acutely injured kidney. *Nephron Clin Pract*. 2014;127(1-4):42-5.
202. Tran M, Tam D, Bardia A, Bhasin M, Rowe GC, Kher A, et al. PGC-1 α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(10):4003-14.
203. Truscott KN, Voos W, Frazier AE, Lind M, Li Y, Geissler A, et al. A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. *J Cell Biol*. 2003;163(4):707-13.
204. Vanasco V, Magnani ND, Cimolai MC, Valdez LB, Evelson P, Boveris A, et al. Endotoxemia impairs heart mitochondrial function by decreasing electron transfer, ATP synthesis and ATP content without affecting membrane potential. *J Bioenerg Biomembr*. 2012;44(2):243-52.
205. Vega RB, Horton JL, Kelly DP. Maintaining ancient organelles: mitochondrial biogenesis and maturation. *Circ Res*. 2015;116(11):1820-34.

206. Ventura B, Genova ML, Bovina C, Formiggini G, Lenaz G. Control of oxidative phosphorylation by Complex I in rat liver mitochondria: implications for aging. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1553(3):249-60.
207. Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(4):1309-13.
208. von Dessauer B, Bongain J, Molina V, Quilodrn J, Castillo R, Rodrigo R. Oxidative stress as a novel target in pediatric sepsis management. *J Crit Care*. 2011;26(1):103.e1-7.
209. Wagner F, Radermacher P, Georgieff M, Calzia E. Sepsis therapy: what's the best for the mitochondria? *Crit Care*. 2008;12(4):171.
210. Weiss SL, Selak MA, Tuluc F, Perales Villarroel J, Nadkarni VM, Deutschman CS, et al. Mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells in pediatric septic shock. *Pediatr Crit Care Med*. 2015;16(1):e4-e12.
211. Welty-Wolf KE, Simonson SG, Huang YC, Fracica PJ, Patterson JW, Piantadosi CA. Ultrastructural changes in skeletal muscle mitochondria in gram-negative sepsis. *Shock*. 1996;5(5):378-84.
212. Wendel M, Heller AR. Mitochondrial function and dysfunction in sepsis. *Wien Med Wochenschr*. 2010;160(5-6):118-23.
213. Wendel M, Heller AR, Koch T. [Pathomechanisms of organ failure. Mitochondrial dysfunction in sepsis]. *Anaesthesist*. 2009;58(4):343-52.
214. White AT, Philp A, Fridolfsson HN, Schilling JM, Murphy AN, Hamilton DL, et al. High-fat diet-induced impairment of skeletal muscle insulin sensitivity is not prevented by SIRT1 overexpression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;307(9):E764-72.
215. Xu C, Yi C, Wang H, Bruce IC, Xia Q. Mitochondrial nitric oxide synthase participates in septic shock myocardial depression by nitric oxide overproduction and mitochondrial permeability transition pore opening. *Shock*. 2012;37(1):110-5.
216. Yamamoto T. Rat liver peroxisomal and mitochondrial fatty acid oxidation in sepsis. *Surg Today*. 1993;23(2):137-43.
217. Yassen KA, Galley HF, Lee A, Webster NR. Mitochondrial redox state in the critically ill. *Br J Anaesth*. 1999;83(2):325-7.
218. Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang MY, Bowmaker M, Jacobs HT, et al. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO J*. 2006;25(22):5358-71.
219. Zhang Z, Sumbilla C, Lewis D, Inesi G. High sensitivity to site directed mutagenesis of the peptide segment connecting phosphorylation and Ca²⁺ binding domains in the Ca²⁺ transport ATPase. *FEBS Lett*. 1993;335(2):261-4.

220. Zhao P, Gao J, Jiang J, Peng X, Wu W, Zheng L, et al. [Myocardial cells and mitochondrial autophagy in sepsis mice induced by lipopolysaccharide]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2016;32(2):177-81.

221. Zheng G, Lyu J, Huang J, Xiang D, Xie M, Zeng Q. Experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis: A narrative review. *J Res Med Sci*. 2015;20(2):185-95.