

Ana Carina Saito Silvestre

**Efeito da tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS) no desacoplamento
mitocondrial da sepse**

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
Infecciosos

Orientador: Professor Doutor Francisco Garcia
Soriano

São Paulo

2022

Ana Carina Saito Silvestre

**Efeito da tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS) no desacoplamento
mitocondrial da sepse**

Versão corrigida

(Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de Pós-graduação)

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
Infecciosos

Orientador: Professor Doutor Francisco Garcia
Soriano

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silvestre, Ana Carina Saito
Efeito da tolerância ao Lipopolissacarídeo (LPS)
no desacoplamento mitocondrial da sepse / Ana
Carina Saito Silvestre. -- São Paulo, 2022.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Imunes e Infeciosos.
Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Sepse 2.Desacoplamento
3.Tolerância imunológica 4.Proteínas desacopladoras
5.Mitocôndria hepática 6.Endotoxina

USP/FM/DBD-464/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças para conseguir concluir mais um projeto da minha carreira e para continuar lutando pelos meus sonhos.

À toda minha família, especialmente meus pais Antonio Silvestre Neto e Yatiyo Saito Silvestre, que são meu exemplo de vida, por todo empenho na minha educação e por sempre me ajudarem a realizar os meus sonhos.

À minha irmã Ana Raquel Saito Silvestre, por ser uma das minhas melhores amigas, por me apoiar nessa etapa da minha vida e pelo incansável auxílio na tradução de artigos para esse projeto.

Ao meu marido André Augusto Botêga Silva, por ter me despertado a paixão pela pesquisa, por toda paciência e incentivo nesse projeto, por ter revisado a dissertação junto comigo e por ser um grande parceiro na minha vida pessoal e profissional.

À toda minha família tieteense que sempre está ao meu lado, proporcionando momentos felizes e de afeto, principalmente Sr. Geraldo Sbompato Botêga (“vô Gê”), D. Maria Aparecida Barros Botêga (“vó Cida”) e minha sogra Cláudia Regina Botêga Silva. Uma lembrança especial *in memoriam* ao meu sogro Clodoaldo Demarchi Silva, que foi um exemplo de superação, ao Sr. João Baptista da Silva (Vô João) e D. Clary Demarchi da Silva (Vó Clary).

A todas as minhas amigas, especialmente Ana Carolina Valentim Hespanha, Ligia Rhein Teixeira e Mariana Martino Magolbo, pelas inúmeras conversas, desabafos e momentos inesquecíveis.

Ao meu orientador, Professor Dr. Francisco Garcia Soriano, pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos e pelas discussões do meu projeto.

A Dra. Denise Frediani Barbeiro e Dr. Hermes Barbeiro, que estiveram comigo em algumas fases do meu projeto, me apoiando e me aconselhando em diversas esferas da minha vida.

Aos professores presentes na banca de qualificação Professor Dr. Luciano Cesar Azevedo, Professor Dr. Heraldo Possolo de Souza, Professor Dr. Rui Curi, pela honra em aceitarem o convite e por todas as dicas que enriqueceram esse trabalho.

A todos do ICB-III (Laboratório 110), que abriram as portas do laboratório, especialmente Thiago Nunes de Menezes, que se disponibilizou para reuniões e discussões do projeto, e Lisley Santos Ramalho, que me auxiliou em um dos experimentos do projeto.

A todos do LIM 51 que estiveram envolvidos direta ou indiretamente nesse projeto, especialmente Thais Martins de Lima e Suely Kunimi Kubo Ariga, que me ensinaram muito ao longo de toda minha trajetória no laboratório, e Juliana de Jesus do Nascimento, que sempre me ajudou nas questões burocráticas e me concedeu ótimas dicas na fase final do trabalho.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”. Leonardo da Vinci.

RESUMO

Silvestre ACS. *Efeito da tolerância ao Lipopolissacarídeo (LPS) no desacoplamento mitocondrial da sepse*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A sepse apresenta disfunções orgânicas decorrentes de resposta inflamatória desregulada que altera as funções celulares. Esse dano celular ocorre com alterações significativas nas vias metabólicas e na função celular. Proteínas desacopladoras (UCPs) estão localizadas na membrana mitocondrial interna, cumprindo funções dentre as quais estão: produção de calor, regulação da produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria. A respiração mitocondrial resulta na extrusão dos prótons (H⁺) para fora das mitocôndrias e para dentro do espaço intermembrana, estabelecendo o potencial da membrana mitocondrial. UCPs bombeiam prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial e, assim, dissipam o gradiente de prótons, reduzem a produção de ATP e diminuem a produção de superóxido. Por isso, as UCPs desempenham funções importantes na regulação redox, nos processos mitocondriais e metabólicos. O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da tolerância ao LPS no desacoplamento mitocondrial em modelo experimental de sepse, além de avaliar o dano mitocondrial através da quantidade de mitocôndrias presente no tecido hepático e estudar o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de tecido hepático. Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c, machos, de 7 semanas de idade, que foram 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*. Os animais foram eutanasiados 24 horas após CLP e foi realizada a coleta do material. Os resultados encontrados no presente estudo revelaram elevação dos níveis de UCP-1 em ambos os grupos que passaram pelo procedimento de CLP e a tolerância não modificou a resposta dos animais. Por outro lado, foi observada redução dos níveis de UCP-2 e UCP-3 tanto em fígado quanto em coração dos animais submetidos à CLP, quando comparados aos grupos Controle e Tolerante, sem influência da tolerância também nessas UCPs. A quantificação de DNA mitocondrial revelou que não houve diferença estatística comparando os grupos em análise. Os dados revelaram redução do consumo de oxigênio do grupo CLP no estado 2 quando comparado aos grupos Controle e Tolerante, assim como redução do consumo de oxigênio do grupo CLPT no Estado 2 quando comparados ao grupo Tolerante, indicando um déficit do metabolismo oxidativo nos animais sépticos. Estudos futuros com outros períodos poderão elucidar o ciclo de metabolismo de UCPs na tolerância e na sepse.

Palavras-chave: Sepse, Desacoplamento, Tolerância imunológica, Proteínas desacopladoras, Mitocôndria hepática, Endotoxinas.

ABSTRACT

Silvestre ACS. *Effect of Lipopolysaccharide (LPS) tolerance on mitochondrial uncoupling of sepsis. [Thesis Monograph]. São Paulo: School of Medicine, Universidade de São Paulo; 2022.*

Sepsis has organic dysfunctions due to a dysregulated inflammatory response that alters cellular functions. This cell damage occurs with significant changes to metabolic pathways and to cellular function. Uncoupling proteins (UCPs) are located in the inner mitochondrial membrane, playing roles that include heat production and regulation of the production of reactive oxygen species by mitochondria. Mitochondrial respiration results in proton extrusion (H⁺) outside the mitochondria and inside the intermembrane space, establishing the mitochondrial membrane potential. UCPs pump protons from the intermembrane space to the mitochondrial matrix and, thus, dissipate the proton gradient, reduce ATP production, and decrease superoxide production. Hence, UCPs play important roles in redox regulation and in mitochondrial and metabolic processes. This study has the purpose of evaluating the effects of LPS tolerance in mitochondrial uncoupling in an experimental model of sepsis, in addition to evaluating mitochondrial damage through the amount of mitochondria present in liver tissue and investigating oxygen consumption in mitochondria isolated from the liver tissue. Male, 7-week-old, Balb/c mice were used, which underwent sepsis stimulation through cecal ligation and puncture (CLP) technique and induction of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) tolerance. The animals were euthanized 24 hours after CLP procedure and the material was collected. The results found in this study show increased levels of UCP-1 in both groups undergoing CLP procedure, and tolerance did not change animal response. On the other hand, a reduction was seen in UCP-2 and UCP-3 levels both in the liver and in the heart of animals undergoing CLP procedure when compared to Control and Tolerant groups, also with no influence of tolerance on these UCPs. The quantification of mitochondrial DNA showed that there were no statistical differences when comparing the groups under analysis. Data showed a reduction in oxygen consumption in CLP group in State 2 when compared to Control and Tolerant groups, as well as a reduction in oxygen consumption in CLPT group in State 2 when compared to the Tolerant group, showing a deficit in oxidative metabolism in septic animals. Future studies with other periods may elucidate the metabolism cycle of UCPs in tolerance and in sepsis.

Keywords: Sepsis, Uncoupling, Immune tolerance, Uncoupling proteins, Liver mitochondria, Endotoxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Respostas Inflamatórias à Sepse	21
Figura 2-Estrutura de um receptor tipo Toll (TLR). TLRs são proteínas transmembranas tipo I com um domínio de repetição rico em leucina (LRR) extracelular e um citoplasmático, denominado domínio do receptor Toll-interleucina 1 (TIR), que é homólogo ao do receptor da interleucina IL-1.	23
Figura 3-Principais compartimentos intracelulares.	26
Figura 4-Estrutura interna da mitocôndria.	27
Figura 5-Ciclo protonofórico catalisado por UCP.	39
Figura 6-Efeito da sepse sobre a fosforilação oxidativa e desacoplamento mitocondrial.	46
Figura 7- Indução de tolerância.	50
Figura 8- Equipamento Oroboros.	55
Figura 9-Esquema ilustrativo do procedimento utilizado na medida do consumo de oxigênio em mitocôndria isolada de tecido hepático.	56
Gráfico 1- Papel da tolerância na sobrevivência dos animais submetidos a CLP (n=20 em cada grupo). No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP), não recebendo nenhuma dose de LPS. No grupo CLPT, os camundongos receberam 5 doses prévias de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias, permaneceram 2 dias em repouso e no oitavo dia foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). Após a realização da indução de tolerância e da CLP, os animais foram observados por 96 horas. A mortalidade foi observada a cada 12 horas. Não houve mortalidade após 96 horas no grupo CLPT. *p<0,05, <i>Log-Rank Test</i>	58
Gráfico 2- Quantificação de UCP-1 em tecido adiposo marrom (Am) de animais submetidos a CLP: papel da tolerância. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram	

submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. Houve aumento de UCP-1 no tecido adiposo marrom dos animais submetidos a CLP e em animais tolerantes submetidos a CLP comparados ao grupo Controle (n=10 em cada grupo). *p<0,05. 59

Gráfico 3-Quantificação de UCP-2 em fígado de animais submetidos a CLP: papel da tolerância. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. Os resultados observados demonstraram que houve redução de UCP-2 nos animais submetidos a CLP e em animais tolerantes submetidos a CLP quando comparados aos grupos Controle e Tolerante. No entanto, não foi observada diferença estatística nos animais tolerantes não sépticos quando comparados ao grupo Controle. n=10 em cada grupo. *p<0,05..... 61

Gráfico 4- Quantificação de UCP-2 em coração de animais submetidos a CLP: papel da tolerância. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. Ao analisarmos a expressão de UCP-2 em coração dos animais, observou-se que houve redução de tal proteína nos animais submetidos a CLP e em animais tolerantes submetidos a CLP quando comparados aos grupos Controle e Tolerante. No entanto, não foi observada diferença estatística nos animais tolerantes não sépticos quando comparados ao grupo Controle. n=10 em cada grupo. *p<0,05. 62

Gráfico 5- Quantificação de UCP-3 em fígado de animais submetidos a CLP: papel da tolerância. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. Os resultados obtidos demonstraram que houve redução de UCP-3 expressa em fígado nos animais submetidos a CLP e em animais tolerantes submetidos a CLP quando comparados aos grupos Controle e Tolerante.

No entanto, não foi observada diferença estatística nos animais tolerantes não sépticos quando comparados ao grupo Controle. n=10 em cada grupo. *p<0,05..... 63

Gráfico 6-Quantificação de UCP-3 em coração de animais submetidos a CLP: papel da tolerância. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. Analisando a expressão de UCP-3 no coração dos animais, observou-se que houve redução de tal proteína nos animais submetidos a CLP e em animais tolerantes submetidos a CLP quando comparados aos grupos Controle e Tolerante. No entanto, não foi observada diferença estatística nos animais tolerantes não sépticos quando comparados ao grupo Controle. n=10 em cada grupo. *p<0,05. 64

Gráfico 7- Quantificação de DNA mitocondrial de animais submetidos a CLP. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. A quantificação de DNA mitocondrial não apresentou diferença estatística entre os grupos estudados. n=10 em cada grupo. *p<0,05..... 65

Gráfico 8- Consumo de oxigênio mitocondrial hepático de animais submetidos a CLP. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. A avaliação da função mitocondrial foi realizada a partir de medidas do consumo de oxigênio mitocondrial nas seguintes condições: basal (Estado 2), estimulação da respiração com ADP (Estado 3), inibição da respiração com Oligomicina (Estado 4), que age diretamente na ATP-sintase bloqueando o movimento de prótons através desse canal; estimulação da respiração máxima com Fluorocarbonil-Cianeto Fenilhidrazona (FCCP-Estado desacoplado). Por fim, foi inferida a eficiência da respiração mitocondrial através do cálculo do controle respiratório, que compreende a razão do Estado 3

pelo Estado 4. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tolerante, @ $p < 0,05$ quando comparado aos demais grupos. $n=10$ em cada grupo.67

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação 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 Medicus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Sepses	17
2.1.1 Patogênese da Sepses	19
2.1.2 Tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS)	24
2.1.3 Mitocôndrias	25
2.1.4 Fosforilação oxidativa	31
2.2 Respiração mitocondrial	33
2.3 DNA mitocondrial	34
2.4 Desacoplamento mitocondrial e proteínas desacopladoras	35
3 HIPÓTESES	47
4 OBJETIVOS	48
4.1 Geral	48
4.2 Específicos	48
5 MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1 Modelo biológico	49
5.2 Constituição dos Grupos	49
5.2.1 Grupo Controle (C)	49
5.2.2 Grupo Tolerante (Tol)	50
5.2.3 Grupo CLP Naive	50
5.2.4 Grupo CLP Tolerante (CLPT)	50
5.3 Anestesia	51
5.4 Ligadura cecal e perfuração para indução a sepses	51
5.5 Curva de sobrevivência	52
5.6 Quantificação das UCPS	52

5.7	Quantificação de mtDNA	53
5.8	Avaliação do metabolismo mitocondrial em tecido hepático submetido à tolerância: isolamento de mitocôndrias e avaliação do consumo de oxigênio	54
5.8.1	Isolamento de mitocôndrias-----	54
5.8.2	Avaliação do consumo de oxigênio -----	54
5.9	Análise estatística	57
6	RESULTADOS -----	58
6.1	Curva de sobrevivência	58
6.2	Proteínas desacopladoras	59
6.2.1	Quantificação da proteína desacopladora 1 (UCP-1) em tecido adiposo marrom -----	59
6.2.2	Quantificação da proteína desacopladora 2 (UCP-2) em fígado -----	60
6.2.3	Quantificação da proteína desacopladora 2 (UCP-2) em coração-----	62
6.2.4	Quantificação da proteína desacopladora 3 (UCP-3) em fígado -----	63
6.2.5	Quantificação da proteína desacopladora 3 (UCP-3) em coração-----	64
6.3	Quantificação de DNA mitocondrial	65
6.4	Respiração mitocondrial	66
7	DISCUSSÃO -----	69
8	CONCLUSÃO -----	80
	REFERÊNCIAS-----	81

1 INTRODUÇÃO

A sepse é definida pela disfunção orgânica secundária a uma resposta desregulada do organismo à infecção. Define-se choque séptico como o subgrupo dos pacientes com sepse que apresentam importantes anormalidades celulares, circulatórias e metabólicas, associadas com maior risco de morte. Os critérios diagnósticos de choque séptico incluem sepse com hipotensão sem resposta a fluidos e necessidade de vasopressor para manter pressão arterial média acima de 65 mmHg após a adequada infusão de fluidos, associada a nível sérico de lactato acima de 2 mmol/L (Shankar-Hari et al., 2016; Singer et al., 2016).

Uma alteração nas novas definições é a eliminação da menção de SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica) no atual consenso. Os critérios da SIRS incluem taquicardia, taquipnéia, hipertermia ou hipotermia e anormalidades na contagem de leucócitos. Estudos demonstraram que a presença de SIRS é praticamente onipresente em pacientes hospitalizados e ocorre em condições benignas, relacionadas ou não à infecção e, portanto, não é adequadamente específica para o diagnóstico de sepse (Abraham, 2016).

O hospedeiro reconhece substâncias do agente etiológico, especialmente os chamados padrões moleculares relacionados aos patógenos (PMRP), estruturas moleculares expressas por grupos de patógenos, que são identificados pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRR), que são expressos por células do sistema imune inato (Flohé et al., 2006). As endotoxinas de bactérias gram-negativas, formadas principalmente por lipopolissacarídeos (LPS), estão entre os mais estudados PMRP. Estas moléculas são transferidas aos receptores CD14 e *Toll-like 4*, existentes na superfície de monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, por uma proteína plasmática ligadora de LPS denominada *LPS-binding protein* (LBP). Nas infecções por bactérias gram-positivas, o TLR2, outra proteína *Toll-like*, é responsável pela sinalização da presença dos proteoglicanos destas bactérias. Após a fase de reconhecimento, ocorrem eventos de ativação celular e produção de citocinas, resultando em Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (Hubacek et al., 2001; Medzhitov, 2001). A deflagração da resposta inflamatória local ou sistêmica pode, quando excessiva, levar a danos celulares, como quebra do DNA, estresse do retículo endoplasmático e alterações da função mitocondrial.

O dano ultraestrutural às mitocôndrias e a inibição da respiração mitocondrial após a sepse em modelos de roedores foram relatados pela primeira vez em 1971. O comprometimento

da fosforilação oxidativa e a depleção de ATP foram observados em modelos animais. A disfunção mitocondrial no fígado e no músculo esquelético pode representar um evento celular precoce no desenvolvimento de falência orgânica (Dare et al., 2009).

Proteínas desacopladoras (UCPs) situadas na membrana mitocondrial interna podem promover o vazamento de prótons na membrana mitocondrial interna. Tratam-se de reguladores essenciais do potencial da membrana mitocondrial, que é capaz de dispersar o gradiente de prótons mitocondriais ao translocar H^+ na membrana interna e, por fim, influenciar a geração de ATP. Fisiologicamente, o desacoplamento é capaz de reduzir a produção de ROS mitocondrial e aumentar a geração de calor (Pan; Wang; Liu D, 2018).

Até o momento, cinco diferentes proteínas de desacoplamento foram identificadas, a saber UCP-1, UCP-2, UCP-3, UCP-4 e UCP-5/ BMCP1, com diferentes distribuições de tecidos e diferentes papéis (Erlanson-Albertsson, 2003).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sepses

A sepsis é uma importante causa de morbidade, mortalidade e utilização de recursos de saúde em todo o mundo. Estima-se que anualmente no mundo 30 milhões de pessoas desenvolvam sepsis, 19 milhões desenvolvam choque séptico e 6 milhões evoluam ao óbito (Peters et al., 2018).

Globalmente, estima-se que ocorram 22 casos de sepsis infantil por 100.000 pessoas por ano e 2.202 casos de sepsis neonatal por 100.000 nascidos vivos, o que representa 1,2 milhão de casos de sepsis infantil ao ano. Mais de 4% de todos os pacientes hospitalizados com menos de 18 anos de idade e 8% dos pacientes internados na unidade de terapia intensiva pediátrica em países de alta renda apresentam sepsis. A mortalidade para crianças com sepsis varia de 4% até 50%, dependendo de fatores de risco, da gravidade da doença e da localização geográfica. A maioria das mortes de crianças em decorrência de sepsis se dá devido ao choque refratário e/ou síndrome da disfunção de múltiplos órgãos, sendo que a maior parte de óbitos ocorre durante as primeiras 48 a 72 horas de tratamento (Weiss et al., 2020).

Em um estudo de pacientes com sepsis tratados em UTIs no Brasil, publicado em 2017 (Machado et al., 2017), foram constatadas taxas elevadas de incidência, prevalência e mortalidade de sepsis, que resultaram em uma estimativa de mais de 200.000 mortes ao ano de pacientes adultos com sepsis ao ano no Brasil. Observou-se também variabilidade substancial na disponibilidade de recursos básicos para o tratamento de sepsis e uma quantidade menor de recursos disponíveis foi associada a resultados piores. Uma possível explicação para essa prevalência elevada é a ausência de unidades de tratamento intermediário na maioria dos hospitais brasileiros, o que poderia ter contribuído para uma permanência maior na UTI e, consequentemente, a uma prevalência mais elevada de sepsis. Foi possível demonstrar que não há diferença na mortalidade de pacientes com sepsis entre UTIs privadas e públicas. Embora a maioria das instituições de saúde brasileiras esteja no sistema privado, a qualidade dos cuidados e a aderência às diretrizes em instituições brasileiras privadas podem variar. Esse achado está em contraste com estudos anteriores, que sugeriram altas taxas de mortalidade em UTIs públicas brasileiras em uma amostra conveniente de instituições, o que provavelmente levou a

um viés de seleção. Esse resultado também está em contraste com os resultados da rede do Instituto Latino-americano de Sepse, nos quais somente instituições privadas apresentaram uma redução prolongada na mortalidade por sepse ao longo dos anos (Machado et al., 2017).

O tratamento precoce pode reduzir a morbidade e a mortalidade relacionadas à sepse, porém isso exige o reconhecimento imediato por parte da equipe. Os estudos que avaliaram a capacidade dos profissionais de saúde em reconhecer pacientes com sepse sugeriram que o conhecimento dos conceitos da sepse é limitado, com taxas baixas de respostas corretas. Foi realizado um estudo multicêntrico e internacional com 1058 médicos de diversas especialidades, em que apenas 22,0% dos intensivistas e 5,0% dos médicos de outras especialidades foram capazes de definir a sepse corretamente ($p < 0,0001$) (Assunção et al., 2010).

Em 2016, novos critérios foram publicados (Sepse-3), definindo a sepse como uma disfunção orgânica de ameaça à vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção. Definiu-se choque séptico como o subconjunto de sepse com infecção grave que causa disfunção celular/metabólica e cardiovascular (incluindo hipotensão, necessidade de tratamento com uma medicação vasoativa ou comprometimento da perfusão) associada a um risco mais elevado de mortalidade. O termo “sepse grave” foi substituído por essa nova definição de sepse (Wiersinga; Seymour, 2018; Weiss et al., 2020).

A nova definição de sepse realça a resposta não homeostática do hospedeiro à infecção, a possível letalidade de uma infecção e a necessidade de reconhecimento rápido, devido ao fato de que mesmo um grau discreto de disfunção orgânica, quando há uma primeira suspeita de infecção, está associada a uma mortalidade hospitalar de mais de 10%. A sepse pode ser amplificada por fatores endógenos, envolvendo a ativação precoce de respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, juntamente com modificações importantes nas vias não imunológicas, como neuronal, hormonal, bioenergética, metabólica, cardiovascular e coagulação (Singer et al., 2016).

Um paradigma central na disfunção orgânica é o conceito de hipóxia tecidual. Foi proposto que a utilização de oxigênio em células comprometidas, denominada “hipóxia citopática”, pode exercer uma função mais importante no desenvolvimento da Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO). A principal questão é que, embora a terapia de oxigênio possa fornecer oxigenação adequada de hemoglobina, o oxigênio pode não ser capaz de ser utilizado pela mitocôndria. Como as mitocôndrias são as principais consumidoras de

oxigênio celular, uma atenção começou a ser dada à disfunção mitocondrial no estabelecimento da hipóxia citopática na SDMO relacionada à sepse (Dare et al., 2009).

As células endoteliais estão entre as primeiras células a entrar em contato com moléculas de agentes infecciosos circulantes. Essas células apresentam mecanismos de reconhecimento de padrões estruturais de patógenos que, ao serem deflagrados, iniciam a expressão de mediadores inflamatórios, gerando uma resposta celular que promove proteção contra infecção. Entretanto, reações exacerbadas de hiperatividade celular podem gerar lesão tecidual. Na sepse, esse equilíbrio é rompido, ocorrendo modificações na produção relativa de diferentes mediadores, resultando em um desequilíbrio anti-inflamatório e pró-inflamatório. Uma das moléculas mais importantes para o desencadeamento da cascata da sepse são as endotoxinas, lipopolissacarídeos (LPS) da parede de bactérias Gram-negativas, que são liberadas em grande quantidade no sangue após a lise bacteriana por antibióticos. O LPS se liga a proteínas de fase aguda produzidas pelo fígado conhecidas como LPB. O complexo LPS-LPB exerce seu papel biológico por meio do CD14, que é expresso em macrófagos e monócitos. Outras vias de reconhecimento de LPS pelo endotélio envolvem o complexo CD11/CD18. A sinalização induzida por componentes da bactéria se dá via receptores *Toll-like* (TLRs), que são capazes de reconhecer diferentes componentes bacterianos (De Backer et al., 2002; Henneke; Golenbock, 2002).

2.1.1 Patogênese da Sepse

Antes da virada do século, a patogênese da sepse era considerada direcionada por uma resposta inflamatória abundante após a invasão de um patógeno. O consenso atual reconhece a ocorrência de duas reações opostas de hospedeiros à infecção grave, com características pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A resposta imune desregulada à infecção está associada a uma falha no retorno à homeostase, resultando na sepse. O sistema de defesa do hospedeiro é capaz de reconhecer componentes moleculares de patógenos invasores (PAMPs) com receptores especializados (PRRs). A estimulação de PRRs causa a ativação de genes alvo que codificam citocinas pró-inflamatórias (ativação leucocitária) e regulação negativa concomitante de mecanismos anticoagulantes. Isso desencadeia um círculo vicioso com progressão para sepse, devido à liberação de moléculas endógenas por células danificadas (DAMPs ou alarminas), que podem ainda estimular PRRs. A supressão imune é caracterizada por apoptose

massiva e, com isso, depleção de células do sistema imunológico, reprogramação de monócitos e macrófagos para um estado de uma capacidade reduzida de liberação de citocinas pró-inflamatórias e uma perturbação do equilíbrio nos processos de metabolismo celular (Kawasaki; Kawai, 2014; Wiersinga; Seymour, 2018).

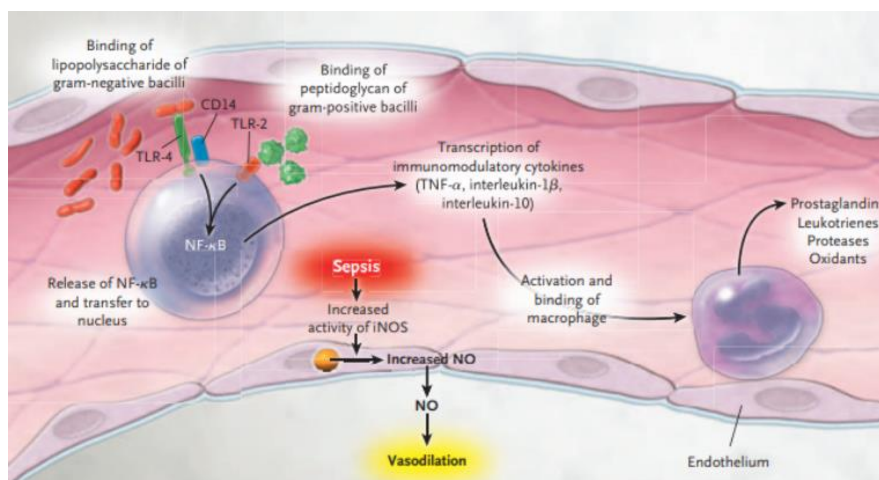
Os mamíferos possuem diversas classes distintas de PPRs, incluindo receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo RIG-I (RLRs), receptores tipo Nod (NLRs), receptores tipo AIM2 (ALRs), receptores de lectina tipo C (CLRs) e sensores intracelulares de DNA, como cGAS. Dentre esses, os TLRs foram os primeiros a serem identificados. A família de TLRs consiste em 10 membros (TLR1-TLR10) em seres humanos e 12 (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) em camundongos. Os TLRs estão localizados na superfície celular ou em compartimentos intracelulares, como endossomo, lisossomo ou endolisossomo; reconhecem PAMPs distintos ou sobrepostos, como lipídio, lipoproteína, proteína e ácido nucleico. Cada TLR é composto por um ectodomínio com repetições ricas em leucina (LRRs) que realizam a mediação do reconhecimento de PAMPs, um domínio de transmembrana e um domínio do receptor citoplasmático Toll/IL-1 (TIR) que inicia a sinalização descendente. Assim, TLRs interagem com seus respectivos PAMPs ou DAMPs na forma de homodímero ou heterodímero, juntamente com um co-receptor ou molécula adicional. Após o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, TLRs fazem o recrutamento de proteínas adaptadoras que contêm o domínio TIR, como MyD88 (*myeloid differentiation protein 88*) e TRIF, que iniciam as vias de transdução de sinal que culminam na ativação de NF- κ B, IRFs ou MAP quinases para regular a expressão de citocinas, quimiocinas e IFNs tipo I que, por fim, protegem o hospedeiro da infecção microbiana (Kawasaki; Kawai, 2014).

Após a ligação entre PMRP e os receptores *Toll-like*, ocorre ativação de vias celulares de sinalização, incluindo a participação das proteínas intracelulares NOD (*nucleotid-binding oligomerization domain*) e MyD88 (*myeloid differentiation protein 88*). A MyD88 interage com a enzima IRAK (quinase associada ao receptor de interleucina-1), ativando quinases I κ Ka e I κ KB, que formam o dímero I κ K, que, por sua vez, "desconecta" a proteína I κ B (inibidor de NF- κ B) ligada ao fator de transcrição nuclear NF- κ B (fator nuclear κ B), responsável pela ativação de genes para transcrição de citocinas. Tal sequência, culminando na liberação de NF- κ B, determina a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas 1 (IL-1), 2 (IL-2), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 12 (IL-12), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e TNF- β (fator de necrose tumoral beta), evento crucial no desenvolvimento de sepse (Cohen, 2002; Siqueira-Batista et al., 2011).

Pode-se dizer que a sepse é o resultado de interações complexas entre o microrganismo infectante e as respostas imunes, respostas inflamatórias e de coagulação do hospedeiro (Hotchkiss; Karl, 2003).

A função do sistema imune é detectar e eliminar patógenos invasores por meio da diferenciação entre antígenos próprios e não próprios. O sistema imune pode ser dividido em imunidade inata e adaptativa. O sistema imune inato responde por meio de receptores de reconhecimento do padrão, como os receptores *toll-like* (TLRs) que interagem com moléculas altamente preservadas presentes nos microrganismos. Os TLRs pertencem a uma família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem partes preservadas de componentes microbianos (PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos). O TLR-2 reconhece um peptidoglicano de bactérias gram positivas, enquanto o TLR-4 reconhece um lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas (Figura 1). A ligação de TLRs a epítomos em microrganismos estimula a sinalização intracelular, aumentando a transcrição de moléculas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina-1 β , bem como citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina 10. As citocinas pró-inflamatórias fazem regulação positiva nas moléculas de adesão em neutrófilos e células endoteliais. Embora os neutrófilos ativados promovam a morte dos microrganismos, eles também danificam o endotélio ao liberar mediadores que aumentam a permeabilidade vascular. Além disso, células endoteliais ativadas liberam óxido nítrico, que junto com as prostaglandinas, levam a vasodilatação de arteríolas com grande queda da resistência vascular periférica e, em algumas situações, podem evoluir para choque séptico (Abbas; Murphy; Sher, 1996; Sandor; Buc, 2005; Russell, 2006).

Figura 1-Respostas Inflamatórias à Sepse

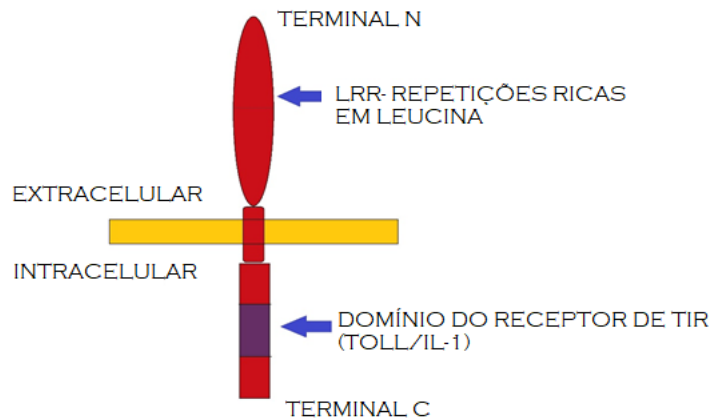


Fonte: Russel, 2006.

A sepse inicia uma resposta inflamatória ativa e no esquema acima são apresentados componentes desse processo. Bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus e fungos possuem moléculas de parede celular denominadas padrões moleculares associados a patógenos, que se ligam a receptores de reconhecimento padrões (receptores tipo *Toll*). O lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas se liga à proteína de ligação a lipopolissacarídeos, o complexo CD14. O peptidoglicano de bactérias gram-positivas e o lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas se ligam ao TLR-2 e ao TLR-4, respectivamente. A ligação de TLR-2 e TLR-4 ativa as vias de transdução de sinal intracelular que levam à ativação do fator nuclear citosólico κ B (NF- κ B). O NF- κ B ativado se move do citoplasma para o núcleo, se liga a sítios de início de transcrição e aumenta a transcrição de citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a interleucina-1 β e interleucina-10. O TNF- α e a interleucina-1 β são citocinas pró-inflamatórias que ativam a resposta imune adaptativa. A interleucina-10 é uma citocina anti-inflamatória que inativa macrófagos. A sepse aumenta a atividade de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), que aumenta a síntese do óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador. As citocinas ativam células endoteliais que passam a apresentar receptores de adesão, levando à migração de neutrófilos, monócitos, macrófagos e plaquetas para o sítio infeccioso. Essas células efetoras liberam mediadores, como proteases, oxidantes, prostaglandinas e leucotrienos, os quais danificam direta ou indiretamente as células endoteliais, levando a um aumento da permeabilidade e alteração do equilíbrio de pró-coagulante-anticoagulante.

O primeiro homólogo de TLR mamífero reconhecido do Toll de *Drosophila* foi o TLR4, identificado em 1997 (Medzhitov; Preston-Hurlburt; Janeway, 1997). Assim como o Toll da drosófila, TLRs humanos são proteínas transmembrana tipo I com um domínio extracelular de repetição rico em leucina (LRR) e um domínio citoplasmático do receptor tipo Toll da interleucina 1 (TIR) (Figura 2) (Sandor; Buc, 2005).

Figura 2-Estrutura de um receptor tipo Toll (TLR). TLRs são proteínas transmembranas tipo I com um domínio de repetição rico em leucina (LRR) extracelular e um citoplasmático, denominado domínio do receptor Toll-interleucina 1 (TIR), que é homólogo ao do receptor da interleucina IL-1.



Fonte: Produção do próprio autor, 2022 (Adaptado de Sandor; Buc, 2005).

A função do TLR4 no reconhecimento de LPS foi confirmada pela geração de TLR4 em camundongos knockout pelo direcionamento genético, comprovando que o TLR4 é essencial para o reconhecimento de LPS (Hoshino et al., 1999). É importante observar que TLR4 não detecta LPS diretamente, exigindo a proteína de ligação a LPS (LPB), que é uma proteína de fase aguda presente no plasma e se liga a uma porção de lipídios A da molécula de LPS (Tobias et al., 1986). O complexo LBP-LPS interage com CD14, uma molécula ancorada em GP1 (glicosilfosfatidilinositol) expressa principalmente em membranas celulares de monócitos, macrófagos e neutrófilos (Sandor; Buc, 2005).

A molécula MD-2 é um requisito para a sinalização de LPS do TLR4. Ela se associa fisicamente com o domínio extracelular de TLR4 humano e se liga à região do lipídio A de LPS sem a necessidade de LBP (Viriyakosol et al., 2000). CD14 intensifica a ligação a MD-2, ligado a TLR4 na superfície celular, que permite a ligação do TLR4 a LPS e permite a formação de complexos receptores estáveis. A imunidade adaptativa detecta antígenos próprios e patogênicos utilizando receptores que são expressos na superfície de células B e T. Por meio do rearranjo de imunoglobulina e do gene receptor de células T, as células B e T produzem respectivamente mais de dez receptores de antígenos exclusivos (Sandor; Buc, 2005).

Os microrganismos estimulam respostas imunes adaptativas específicas humorais mediadas por células que amplificam a imunidade inata. Os linfócitos T são modificados na sepse. Células T *helper* (CD4+) podem se diferenciar em células *helper* tipo 1 (Th1) ou células *helper* tipo 2 (Th2) sob diferentes estímulos. As células Th1 ativadas são programadas para secretar citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , interferon- γ e interleucina-1 β , enquanto as células Th2 secretam citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 4 e interleucina 10, dependendo do organismo infectante, da carga de infecção, entre outros fatores (Hotchkiss; Karl, 2003; Foster; Hargreaves; Medzhitov, 2007).

Na sepse, pode ocorrer ainda alteração do equilíbrio pró-coagulante–anticoagulante, com aumento dos fatores pró-coagulantes e uma redução dos fatores anticoagulantes. O lipopolissacarídeo estimula as células endoteliais, fazendo um feedback positivo para o fator tecidual, ativando a coagulação. O fibrinogênio é então convertido em fibrina, levando à formação de trombos microvasculares, amplificando a lesão. Fatores anticoagulantes, tais como proteína C, proteína S, antitrombina III e inibidor da via do fator tecidual, modulam a coagulação. A trombina α se liga à trombomodulina para ativar a proteína C ao se ligar ao receptor endotelial da proteína C. A proteína C ativada inativa os fatores Va e VIIIa e inibe a síntese do inibidor do ativador de plasminogênio 1. A proteína C ativada diminui a apoptose, a adesão de leucócitos e a produção de citocinas (Abbas; Murphy; Sher, 1996; Russell, 2006).

A sepse reduz os níveis de proteína C, proteína S, antitrombina III e inibidor da via do fator tecidual. O lipossacarídeo e o TNF- α reduzem a síntese de trombomodulina e do receptor da proteína C endotelial, comprometendo a ativação da proteína C, e aumentam a síntese do inibidor de ativador de plasminogênio 1, comprometendo assim a fibrinólise (Cavaillon; Adib-Conquy, 2006).

2.1.2 Tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS)

O lipopolissacarídeo (LPS) é um indutor potente de inflamação, exercendo seus efeitos por meio do receptor tipo *Toll* (TRL) 4, que é essencial para o reconhecimento de componentes da parede celular bacteriana. A inibição da sinalização de TRL por reguladores negativos induzíveis, citocinas anti-inflamatórias e alterações no complexo de sinalização de TLR foi atribuída ao fenômeno de “tolerância ao LPS”. A tolerância a endotoxinas é definida como uma responsividade reduzida a um desafio de LPS após um primeiro encontro com a endotoxina. A

tolerância a LPS envolve a participação de macrófagos e mediadores como glicocorticoides, prostaglandinas, interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento beta. Estudos da sinalização celular em leucócitos de pacientes com sepse revelaram diversas alterações semelhantes às aquelas observadas em células tolerantes a endotoxinas. O termo “reprogramação celular” é útil na descrição do status imune de leucócitos circulantes durante o estabelecimento da tolerância a endotoxinas. A tolerância a LPS demonstrou proteção contra infecções bacterianas, sendo um modelo de uma resposta imune adequada, ao contrário da desregulação fatal da função imune na sepse (Cavaillon; Adib-Conquy, 2006; Foster; Hargreaves; Medzhitov, 2007; Melo et al., 2010).

Em animais, a tolerância ao LPS é um mecanismo eficaz de proteção contra a sepse. Tal fenômeno, que aparentemente prepara o organismo para uma infecção subsequente, foi originalmente descrito como uma forma de “mortalidade atenuada associada a endotoxinas”, não necessariamente relacionada à produção de citocinas (West; Heagy, 2002).

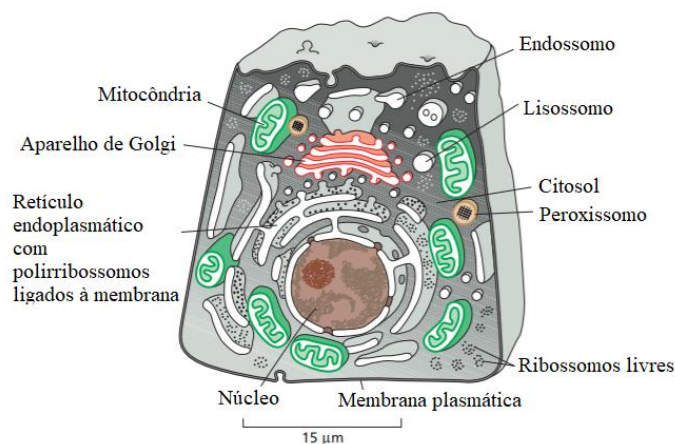
A indução da tolerância faz com que um segundo estímulo inflamatório apresente uma redução significativa nos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MIP-2, mas não de IL-10. Assim, a tolerância induz uma resposta anti-inflamatória evidente, uma vez que a produção de IL-10 permanece inalterada em animais tolerantes e as citocinas pró-inflamatórias ficam reduzidas. O modelo de tolerância ao LPS proporciona um efeito protetor na sepse, uma vez que é caracterizado por alterações no sistema imunológico que ajudam o sistema a permanecer corretamente regulado durante a sepse (Melo et al., 2010).

2.1.3 Mitocôndrias

O funcionamento das células depende de fornecimento de energia e as mitocôndrias cumprem o papel de produzir ATP, que é um estoque químico de energia. Nas células eucarióticas, a maior parte do ATP é produzida por organelas conversoras de energia. Existem dois tipos: as mitocôndrias, presentes em quase todas as células de animais, plantas e fungos; e os cloroplastos, que estão presentes somente em plantas e algas verdes, aproveitando a energia solar para produzir ATP pela fotossíntese. As principais características de mitocôndrias observadas em micrografias eletrônicas são seus sistemas de membranas internas, as quais contêm conjuntos de complexos de proteínas que atuam em grupo para produzir a maior parte do ATP celular (Alberts, 2015).

As mitocôndrias ocupam de 20%-25% do volume citoplasmático de uma célula eucariótica, são extremamente dinâmicas, movendo-se pela célula, mudando de forma, dividindo-se e fusionando-se e costumam estar associadas ao citoesqueleto microtubular, o que determina sua distribuição e orientação em diferentes tipos celulares: em células altamente polarizadas como neurônios, as mitocôndrias podem se mover por longas distâncias enquanto em outras células, as mitocôndrias permanecem fixas em locais de alta demanda energética; por exemplo, em células musculares esqueléticas ou cardíacas, elas se acumulam entre miofibrilas. As mitocôndrias interagem com outros sistemas de membranas, sobretudo com o retículo endoplasmático (RE) (Figura 3). Contatos entre mitocôndrias e RE definem domínios especializados que supostamente facilitam a troca de lipídeos entre os dois sistemas de membranas e podem induzir fissão mitocondrial (Alberts, 2015; Lodish, 2016).

Figura 3-Principais compartimentos intracelulares.

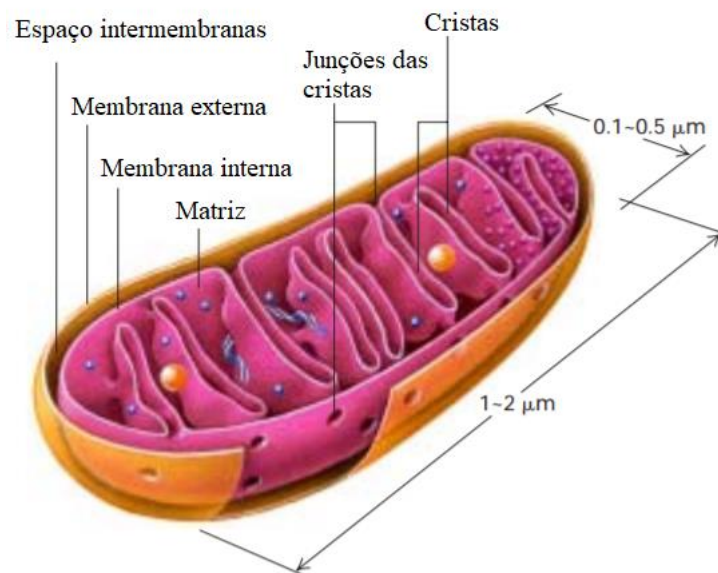


Fonte: Adaptado Alberts, 2015.

As mitocôndrias são organelas móveis e plásticas, que formam uma rede dinâmica na maioria das células, onde são constantemente submetidas à fissão e fusão. O número de mitocôndrias em uma célula pode variar amplamente por organismo, tecido e tipo de célula. As mitocôndrias consistem em uma organização especializada de dupla membrana, essencial para a geração de uma força próton-motriz e para a produção de energia. A função primária das mitocôndrias é a produção de adenosina trifosfato (ATP), um substrato primário de energia celular. As mitocôndrias também estão envolvidas na regulação de cálcio, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), desacoplamento e desempenham função na apoptose mediada pelo citocromo c (Jang et al., 2017).

As mitocôndrias são organelas celulares onde ocorre a respiração. As duas membranas da mitocôndria diferem na composição e na função. A membrana externa, composta de cerca de metade de lipídios e metade de proteínas, contém porinas que fazem com que a membrana seja permeável a moléculas pequenas. A membrana interna, que é muito menos permeável, consiste em cerca de vinte por cento de lipídios e oitenta por cento de proteínas. A membrana interna transporta substratos de ânions, como ADP, ATP, fosfato, oxoglutarato, citrato, glutamato e malato. A área de superfície da membrana interna é aumentada por grande quantidade de reentrâncias (ou cristas) que se sobressaem para dentro da matriz, ou espaço central (Figura 4). Em células não fotossintéticas, os principais combustíveis para a síntese de ATP são ácidos graxos e glicose. Em células eucarióticas, os estágios iniciais de degradação da glicose ocorrem no citosol, onde 2 moléculas de ATP por molécula de glicose são geradas. Os estágios terminais de oxidação e a síntese acoplada de ATP são realizados por enzimas na matriz mitocondrial e na membrana interna. Até 28 moléculas de ATP por molécula de glicose são geradas nas mitocôndrias. Da mesma forma, quase todo ATP formado na oxidação de ácidos graxos em CO_2 é gerado nas mitocôndrias (Rousset et al., 2004; Lodish, 2016).

Figura 4-Estrutura interna da mitocôndria.



Fonte: Adaptado Lodish, 2016.

As mitocôndrias são consideradas “usinas de força” da célula, consumindo 90% do oxigênio celular para gerar energia em forma de ATP por meio de fosforilação oxidativa. NADH e FADH₂, os substratos necessários para abastecer a produção de energia, são gerados

por meio do ciclo de ácido tricarboxílico (TCA), doando elétrons nos complexos I (oxidação de NADH) e II (oxidação de FADH₂) e, então, tais elétrons fluem pela cadeia para o complexo IV. Os prótons são concomitantemente bombeados dos complexos I e IV e translocados do complexo III para o espaço intermembrana. O complexo V aproveita esse gradiente para fosforilar ADP em ATP por meio da enzima ATP sintase. O oxigênio representa o receptor final de elétrons, aceitando quatro elétrons no complexo IV para ser reduzido em água (Dare et al., 2009).

A cadeia ou o sistema de transporte de elétrons (ETS) transfere elétrons através de uma série de reações redox. Dois elétrons doados de NADH + H⁺ para o complexo I (NADH desidrogenase) ou de succinato para o complexo II (succinato desidrogenase) são passados sequencialmente para ubiquinona para fornecer ubisemiquinona e então ubiquinol. O ubiquinol transfere seus elétrons para o complexo III (ubiquinol: citocromo c oxidorreductase), que os transfere para o citocromo c. A partir do citocromo c, os elétrons passam para o complexo IV (citocromo c oxidase) e, por fim, para o oxigênio, para fornecer H₂O. Com exceção do complexo II, a transferência de elétrons aos complexos gerará uma força próton-motriz pelo bombeamento de prótons contra um gradiente. O gradiente eletroquímico é então utilizado pelo complexo V para a produção de ATP. Com exceção do complexo IV, todas as reações são reversíveis. A disfunção mitocondrial observada na sepse está ligada ao comprometimento do fluxo de elétrons por meio do ETS e à lesão aos complexos. Há também aumento da condutância de prótons por meio da membrana ou vazamento, o que pode indicar dano mitocondrial. Isso resultará em uma alteração da fosforilação oxidativa, causando insuficiência de energia e morte celular (Jang et al., 2017).

Sem as mitocôndrias, as células teriam que produzir ATP por meio da glicólise anaeróbica. Quando a glicose é convertida em piruvato pela glicólise, apenas uma fração de toda energia livre disponível é liberada. Nas mitocôndrias, o metabolismo de açúcares é completo: o piruvato é importado para dentro da mitocôndria e oxidado pelo O₂ em CO₂ e H₂O, o que possibilita a produção de 15 vezes mais ATP do que o produzido apenas pela glicólise (Alberts, 2015).

As mitocôndrias também são essenciais para o tamponamento dos produtos de oxidação no citosol e desempenham uma parte essencial na adaptação metabólica das células às condições nutricionais, ou seja, em condições de inanição, proteínas do corpo são degradadas em aminoácidos, os quais são importados para as mitocôndrias e oxidados para produzir NADH destinado à produção de ATP. As mitocôndrias também são importantes como tampões de

cálcio, capturando cálcio do RE e retículo sarcoplasmático em junções de membrana especiais (Alberts, 2015).

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de mitocôndrias foi registrada pela primeira vez há mais de 40 anos, seguida pela detecção de ânions radicais superóxido gerados nas mitocôndrias (O_2^-), evidenciando essa organela como fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS). O metabolismo de energia mitocondrial é reconhecido como a fonte de ROS quantitativamente mais importante na maioria dos tipos de células eucarióticas. Como H_2O_2 é estável e permeável na membrana, pode se difundir dentro da célula e ser removido por sistemas antioxidantes citosólicos, como catalase, glutathione peroxidase e tioredoxina peroxidase. Moléculas de peróxido de hidrogênio geradas por mitocôndrias também podem agir como sinalizadoras no citosol, afetando redes que controlam o ciclo celular, a resposta a estresse, o metabolismo de energia e o equilíbrio redox. Dentro das mitocôndrias, foram descobertos efeitos de sinalização de H_2O_2 , incluindo função na ativação de vias de desacoplamento mitocondrial leve, que são, por si, importantes reguladores da geração de ROS mitocondriais. As mitocôndrias apresentam também peroxirredoxinas eficientes e redutases associadas para remover H_2O_2 . Essas incluem o sistema glutathione peroxidase/glutathione redutase mitocondrial, que remove H_2O_2 utilizando glutathione reduzida como uma fonte de elétrons, e o sistema tioredoxina peroxidase/tioredoxina redutase mitocondrial, que utiliza elétrons a partir da tioredoxina. A tioredoxina e a glutathione mitocondriais são reduzidas por NADPH. Logo, os níveis de NADPH estão relacionados à capacidade antioxidante das mitocôndrias. Nas mitocôndrias, NADP é reduzida, em parte, pela atividade de NADH/NADP trans-hidrogenase, que funciona como uma bomba de prótons, utilizando o gradiente H^+ eletroquímico gerado pela respiração para deslocar a reação para formação de NADPH, relacionando o acoplamento mitocondrial e o potencial da membrana ao potencial redox. Caso as mitocôndrias não estejam totalmente acopladas ou caso o potencial da membrana diminua, a trans-hidrogenase relacionada à energia pode ser incapaz de responder prontamente a níveis elevados de oxidação de NADPH, e o dano oxidativo pode ocorrer devido à taxa mais baixa de remoção de hidroperóxido (Talbot; Lambert; Brand, 2004; Kowaltowski et al., 2009; Pan; Wang; Liu, 2018).

Além da fosforilação oxidativa e das vias metabólicas, as mitocôndrias estão envolvidas na termogênese, produção de radicais, homeostase de cálcio e síntese de proteínas. Embora a respiração esteja acoplada à fosforilação de ADP, esse acoplamento pode estar parcialmente ou muito parcialmente fraco. As proteínas desacopladoras (UCPs) são

transportadoras mitocondriais específicas da membrana interna que controlam o grau de acoplamento da respiração celular. Além disso, as mitocôndrias possuem funções em processos fisiológicos e patofisiológicos, incluindo vias de sinalização celular, regulação transcricional e apoptose. Múltiplos aspectos da disfunção mitocondrial, como a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), a depleção de adenosina trifosfato (ATP), a perturbação do potencial da membrana mitocondrial (MMP) e a exacerbação da apoptose, são considerados decorrentes da sepse (Rousset et al., 2004).

Mitocôndrias são organelas bioenergéticas dinâmicas com inúmeras funções, que vão desde o metabolismo e a produção de ATP até a modulação de eventos de sinalização que levam à sobrevivência ou morte celular. Canais de íons localizados nas membranas mitocondriais controlam a função mitocondrial. As mitocôndrias podem ser reconhecidas como a “potência” da célula, onde a energia armazenada em nutrientes é convertida em moléculas de ATP através da fosforilação oxidativa. Além da produção de ATP, as mitocôndrias também desempenham papéis fundamentais em diversas funções celulares, incluindo metabolismo de ácidos graxos/aminoácidos, homeostase de Ca^{2+} , termogênese, sinalização redox e morte celular (Chouchani; Kazak; Spiegelman, 2019; Urbani et al., 2020). As mitocôndrias consistem na principal fonte de ROS da célula, uma vez que oxigênio é utilizado como o receptor final de elétrons durante a respiração. O oxigênio (O_2) é capaz de aceitar um elétron por vez devido à sua estrutura química. Durante a redução de O_2 em H_2O , intermediários reativos, especificamente superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-) são gerados. Esse dano oxidativo está associado à disfunção mitocondrial. Para evitar os efeitos prejudiciais de ROS, as células utilizam sistemas para manter as ROS dentro de limites toleráveis. Isso é importante nas mitocôndrias, uma vez que as enzimas que orientam a produção de ATP são ricas em resíduos de tióis que podem ser oxidados de maneira irreversível. A emissão de ROS aumenta e diminui rapidamente a partir de mitocôndrias de funcionamento normal. Um mecanismo que ajusta o potencial da membrana pode ser utilizado para modular de forma aguda alterações na produção de ROS a partir das mitocôndrias. O vazamento de prótons por UCP-2 e UCP-3 representam um desses mecanismos, uma vez que são ativados por pequenas elevações não tóxicas em ROS e podem modular a emissão de ROS mitocondriais (Mailloux; Harper, 2012).

Diversas condições aumentam o transporte de elétrons, incluindo a fosforilação oxidativa, desacoplamento e ativação de vias respiratórias alternativas. Foi demonstrado que o aumento das taxas respiratórias *in vivo* pelo uso de doses baixas de desacoplador é uma

estratégia antioxidante efetiva, evitando maior dano oxidativo a biomoléculas observadas em camundongos saudáveis. Além disso, dados *in vitro* demonstraram a prevenção da formação de ROS associada ao desacoplamento mitocondrial e elevações das taxas respiratórias. Ao aumentar o consumo de O₂, o transporte intensificado de elétrons pode evitar a formação de ROS ao diminuir a tensão de O₂ no microambiente mitocondrial. Um segundo efeito do transporte intensificado de elétrons é favorecer níveis mais oxidados de intermediários da cadeia respiratória, como os Complexos I e III, conhecidos por serem fontes substanciais de ROS. Vias mitocondriais que reduzem a eficiência da fosforilação oxidativa e aumentam o transporte de elétrons, incluindo proteínas desacopladoras, canais de K⁺ sensíveis a ATP e a oxidase alternativa, foram relatadas por impedirem a liberação de ROS por tais organelas. Sabe-se que proteínas desacopladoras e canais de mitoK_{ATP} são ativados por oxidantes, resultando em um sistema de feedback negativo que controla a formação de ROS mitocondriais ao promover o desacoplamento leve. Além de serem sensíveis a redox, tais vias de dissipação de energia também são reguladas por condições metabólicas; proteínas desacopladoras dependem de ácidos graxos livres para aumentar o transporte de prótons transmembrana mitocondrial. Portanto, o metabolismo de energia mitocondrial e o estado redox estão inter-relacionados em diversos níveis (Echtay et al., 2002; Kowaltowski et al., 2009).

Existem pontos no transporte de elétrons e em sistemas de fosforilação nos quais a disfunção mitocondrial pode acontecer. O desacoplamento da disponibilidade de oxigênio a partir da utilização celular e o desacoplamento do consumo de oxigênio a partir da produção de ATP são os pontos principais de vulnerabilidade que podem mediar o dano celular e promover a disfunção orgânica (Dare et al., 2009).

2.1.4 Fosforilação oxidativa

O processo da utilização de oxigênio na formação de ATP a partir de carbono é denominado fosforilação oxidativa. Mitchell descreveu o acoplamento da corrente de elétrons análogo à cadeia de transporte de elétrons para a corrente de prótons, que é formada pelo bombeamento de prótons fora da matriz para dentro do espaço intermembrana e o subsequente retorno de prótons para a matriz por meio de ATP sintase. No final dos anos 1970, foi reconhecido que o retorno de prótons para a matriz poderia desviar da ATP sintase devido à presença de uma proteína desacopladora (UCP) no tecido adiposo marrom. Quando produzidas

de maneira controlada, as ROS desempenham funções de sinalização importantes, por exemplo, as ROS mitocondriais modulam as vias de sinalização de insulina, mecanismos de transcrição gênica e o fluxo da via metabólica (Mailloux; Harper, 2012).

A molécula carreadora ativada mais importante que as células possuem é o ATP (adenosina trifosfato), que funciona como um depósito versátil e é utilizado para que diversas reações químicas possam ocorrer nas células. O ATP é sintetizado em uma reação de fosforilação desfavorável do ponto de vista energético, na qual um grupo fosfato é adicionado à ADP (adenosina difosfato). Quando necessário, o ATP doa certa quantidade de energia por meio de sua hidrólise, energeticamente favorável, formando ADP e fosfato inorgânico. O ADP regenerado fica disponível para ser utilizado em outro ciclo de reação de fosforilação que forma novamente ATP. A reação energeticamente favorável da hidrólise do ATP é acoplada a outras reações (que sem esse acoplamento seriam desfavoráveis), nas quais são sintetizadas outras moléculas. Muitas dessas reações acopladas envolvem a transferência do fosfato terminal do ATP para alguma outra molécula (Alberts, 2015).

A fosforilação oxidativa é definida como a fosforilação de adenosina difosfato (ADP) em ATP com o uso de energia armazenada como um gradiente eletroquímico de prótons derivado da atividade de ETC. Durante esse processo, a ETC transfere prótons através da membrana mitocondrial interna por meio de três complexos enzimáticos de bombeamento de prótons (NADH: ubiquinona oxidoreductase (I), citocromo c redutase (III) e citocromo c oxidase (IV)). O acúmulo de prótons no espaço intermembrana cria um gradiente eletroquímico conhecido como força próton-motora, que é utilizada pela ATP sintase para catalisar a síntese endergônica de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico. O ATP gerado na matriz mitocondrial é exportado para o citoplasma pelo translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) para atender à demanda de energia citoplasmática. A fosforilação oxidativa mitocondrial é uma fonte de produção de ATP hepatocelular em condições aeróbicas. Dentro das mitocôndrias, o acoplamento entre a taxa de oxidação e a taxa de geração de ATP (fosforilação) pode ser regulado. Em homeostase, a eficiência da fosforilação oxidativa é definida de modo que o acoplamento entre a oxidação de substratos (respiração mitocondrial) e a produção de ATP possa atender à demanda celular de ATP. Em contrapartida, quando o estímulo da oxidação de substratos (consumo de oxigênio mitocondrial) não leva a um aumento na geração de ATP em proporção estequiométrica, isso expressa um desacoplamento das reações de oxidação e fosforilação (Eyenga et al., 2022).

2.2 Respiração mitocondrial

Uma das principais consequências da resposta inflamatória do organismo à sepse consiste em comprometimento da extração e utilização de oxigênio pelo tecido periférico, que decorre de alterações na distribuição do fluxo sanguíneo microvascular, com fluxo e fornecimento de oxigênio inadequados a determinadas células. Outro fator que pode contribuir para o comprometimento do uso de oxigênio na sepse é uma alteração na função mitocondrial. Em diversos estudos, reduções nas taxas máximas de consumo de oxigênio em Estado 3, desacoplamento de fosforilação oxidativa, redução na atividade de ATP sintase (ou seja, complexo V) e inibição da cadeia de transporte de elétrons (ou seja, redução na atividade dos complexos I-IV) foram relatadas na sepse. Qualquer uma dessas alterações na função mitocondrial pode comprometer a fosforilação oxidativa, reduzindo a capacidade do tecido em utilizar oxigênio para atender às demandas metabólicas. Radicais livres (óxido nítrico, superóxido, peroxinitrito) desempenham uma função importante na indução de disfunção de órgãos relacionada à sepse. A geração de radicais livres é aumentada por múltiplos mecanismos, com aumento da geração de óxido nítrico e superóxido em células parenquimais e em torno delas. Um estudo relacionou a formação de radicais livres ao desacoplamento da fosforilação oxidativa nessa condição (Callahan et al., 2001).

A avaliação do consumo de oxigênio é utilizada para avaliar a função respiratória de diferentes amostras tais como células intactas, mitocôndrias isoladas e fragmentos de tecidos. Um dos métodos mais sensíveis é a determinação do consumo de oxigênio utilizando oxígrafo com eletrodos sensíveis ao oxigênio (oxígrafo OROBOROS), através do qual se obtém informações relacionadas a aspectos da função mitocondrial, como utilização de substratos, acoplamento entre o consumo de oxigênio e a síntese de ATP, além de parâmetros envolvendo cinética enzimática (Gnaiger, 2008).

A respiração basal é uma medida do consumo de oxigênio em decorrência da combinação da produção de ATP e o vazamento de prótons. Isso representa a demanda de energia em condições de estado de equilíbrio. Após a medição da respiração basal, as células são expostas à oligomicina, um inibidor do complexo V. A respiração mitocondrial remanescente após a injeção de oligomicina é atribuível ao vazamento de prótons. Embora certo vazamento de prótons esteja previsto em condições fisiológicas, um vazamento significativo de prótons pode ser uma indicação de dano ao complexo e/ou à membrana mitocondrial. O uso de oligomicina também permite uma estimativa do consumo de oxigênio secundário à produção

de ATP. A adição de um desacoplador mitocondrial, como dinitrofenol ou carbonil cianeto-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona estimula a respiração máxima ao simular uma demanda fisiológica de energia, causando um aumento no consumo de oxigênio. A diferença entre a respiração máxima e a respiração basal representa a capacidade respiratória de reserva (SRC) da célula. A SRC indica a capacidade da célula de responder ao estresse energético e o quão próximo ao seu limite bioenergético uma célula está operando. Uma redução na SRC pode limitar a capacidade da célula de controlar um fator de estresse, resultando na disfunção mitocondrial. A SRC é uma medida de reserva mitocondrial disponível para que as células produzam ATP em resposta a um aumento na demanda metabólica induzido por estresse, como a sepsis. Uma redução na SRC indica disfunção mitocondrial que pode não ser aparente até que haja um estresse com uma demanda de ATP. Células que enfrentam demandas metabólicas intensas podem não ter a reserva bioenergética, levando à disfunção orgânica (Jang et al., 2017).

2.3 DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial produz proteínas específicas do funcionamento mitocondrial. A mitocôndria possui um DNA próprio localizado em sua matriz. Cada nova mitocôndria formada no citoplasma da célula tem o seu próprio conteúdo de DNA, em contraste com o genoma nuclear humano que apresenta um único conjunto de DNA nuclear. Essas características de DNA mitocondrial e nuclear permitem utilizar a quantificação de um gene do DNA mitocondrial como um indicador do número de mitocôndrias por célula. Para essa quantificação do número de mitocôndrias, será feita a normalização do DNA mitocondrial com o DNA nuclear.

O mtDNA é uma molécula circular que codifica as principais proteínas envolvidas no sistema de fosforilação oxidativa. O envolvimento com funções imunes celulares é mediado por mtDNA, que sai da margem das mitocôndrias para outros compartimentos, nos quais é capaz de desencadear ou promover respostas imunes ao ser reconhecido como um DAMP. Quando as células (macrófagos, por exemplo) são expostas a padrões moleculares associados a patógenos e/ou DAMPs, tais células aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondriais, o que pode diminuir o potencial da membrana mitocondrial, levando ao comprometimento da integridade da membrana. Essas alterações poderiam permitir o vazamento de mtDNA no citosol (Krychtiuk et al., 2015; Harrington; Choi; Nakahira, 2017).

A sepse reduz os níveis de ATP, aumenta os biomarcadores de disfunção mitocondrial e reduz a defesa antioxidante. Níveis cumulativos de ROS durante a sepse podem causar dano a DNA e proteínas mitocondriais no fígado e no coração de ratos, comprometendo a função mitocondrial e levando a um ciclo vicioso no qual a produção de ROS continua a aumentar. Por outro lado, a biogênese das mitocôndrias está associada a um aumento na sobrevivência em choque séptico. Mecanismos de controle de qualidade mitocondrial, que consistem em biogênese (produção de novas mitocôndrias), fissão/fusão de mitocôndrias e mitofagia (remoção de mitocôndrias danificadas) podem neutralizar a disfunção mitocondrial (Van der Slikke et al., 2021).

A autofagia mitocondrial inadequada (mitofagia) leva à redução da massa mitocondrial e à disfunção de mitocôndrias. Os complexos I e III da cadeia respiratória produzem pequenas quantidades de ROS fisiologicamente. A sepse é acompanhada por aumento do estresse oxidativo e grandes quantidades de ROS são provenientes de neutrófilos ativados. Um conjunto de evidências sugere fortemente que ROS e espécies reativas de nitrogênio causam comprometimentos específicos de fosforilação oxidativa no miocárdio em sepse (p. ex., complexo I, complexo IV), especialmente mitocôndrias de células miocárdicas (Pan; Wang; Liu, 2018).

2.4 Desacoplamento mitocondrial e proteínas desacopladoras

De acordo com a teoria proposta por Peter Mitchell, a transferência de elétrons mitocondriais é acompanhada por fluxos de prótons e acoplada através de bombas de prótons redox mediadas por complexos mitocondriais (CI, CIII e CIV). Os prótons podem escapar diretamente do espaço mitocondrial interno por difusão através da membrana mitocondrial interna, em um processo denominado vazamento de prótons basal, o qual depende essencialmente da composição da membrana mitocondrial interna e pode representar até 30-50% da taxa metabólica celular em repouso. Tal processo também pode ser regulado por um conjunto de proteínas: UCPs (Proteínas Desacopladoras) ou ANTs (Adenina Nucleotídeo Translocases). A segunda família de proteínas desacopladoras, denominada ANT, consiste em 4 membros em seres humanos (ANT-1 - ANT-4) que catalisam a troca de ATP/ADP na membrana mitocondrial e desempenham uma função importante na exportação de ATP para o

citossol (Boss; Muzzin; Giacobino, 1998; Pan; Wang; Liu, 2018; Demine; Renard; Arnould, 2019).

Sabe-se que a síntese de ATP mitocondrial e a respiração estão acopladas, porém a menor utilização de ATP inibe o consumo de oxigênio e a taxa de respiração aumenta quando as mitocôndrias sintetizam mais ATP, levando ao conceito de controle respiratório por fosforilação de ATP. Há um mecanismo de retroalimentação que controla a síntese de ATP induzida pela respiração mitocondrial. Após a proposta feita por Peter Mitchell (teoria quimiosmótica), foi demonstrado que o gradiente de prótons eletroquímicos mitocondriais, gerado na forma de elétrons que são transmitidos pela cadeia respiratória, é a fonte primária para a síntese de ATP celular. A cadeia respiratória mitocondrial é composta por cinco complexos. Os complexos I, III e IV fazem o bombeamento de prótons para fora da membrana interna, gerando um gradiente de prótons que é consumido pelo complexo V, que catalisa a síntese de ATP. Além da reentrada de prótons por meio de ATP sintase, um vazamento de prótons representa outro mecanismo de consumo do gradiente de prótons mitocondriais. A teoria de Mitchell previu que qualquer vazamento de prótons não acoplado com a síntese de ATP poderia provocar o desacoplamento da respiração e da termogênese. Além da termogênese adaptativa, o desacoplamento da respiração permite a reoxidação contínua de coenzimas que são essenciais para as vias metabólicas, além de evitar um aumento exagerado do nível de ATP que inibiria a respiração (Rousset et al., 2004).

Os elétrons podem vazar da cadeia de transferência de elétrons e levar à produção de ânion superóxido ou do radical hidroperoxila. O desacoplamento mitocondrial pode ser causado por condições que exercem uma influência não somente sobre o vazamento de prótons e a ciclagem de cátions, mas também sobre o deslizamento de prótons dentro das bombas de prótons e sobre a integridade estrutural das mitocôndrias (Demine; Renard; Arnould, 2019).

Em 1976, foi descoberta a primeira proteína desacopladora mitocondrial, específica de tecido adiposo marrom, a proteína desacopladora 1 (UCP-1), a qual pertence à família de proteínas carreadoras de ânions mitocondriais, localizadas na membrana interna dessas organelas (Ricquier, 1976).

A proteína desacopladora UCP-1 é reconhecida por sua função termogênica exclusivamente na configuração bioenergética do mecanismo de fosforilação oxidativa (OXPHOS) em mitocôndrias do tecido adiposo marrom (Azzu; Brand, 2010; Ježek et al., 2018).

Adipócitos marrons diferem de adipócitos brancos por uma inervação simpática, um núcleo central, gotículas de triglicérides e inúmeras mitocôndrias. Estudos de mitocôndrias isoladas do tecido adiposo marrom revelaram uma taxa respiratória elevada e uma respiração desacoplada não controlada por ADP. Uma respiração não acoplada com a síntese de ATP representa um processo termogênico importante. A capacidade termogênica elevada do tecido adiposo marrom de ratos adaptada para o frio está em paralelo com a UCP elevada em mitocôndrias (Rousset et al., 2004).

A UCP-1 é predominantemente expressa em tecido adiposo marrom, onde representa aproximadamente 10% do conteúdo de proteína mitocondrial. Evidências indicam a existência de dois tipos de adipócitos termogênicos que expressam UCP-1: os adipócitos marrons clássicos e adipócitos bege. Uma das diferenças mais proeminentes entre o adipócito marrom e bege é que as células marrons expressam altos níveis de UCP-1 e outros genes termogênicos em condições basais, enquanto os adipócitos bege apenas expressam tais genes em resposta a ativadores, como β -adrenérgicos e agonistas do receptor γ ativados pelo proliferador de peroxissoma (Busiello; Savarese; Lombardi, 2015).

A proteína desacopladora 1, antigamente conhecida como termogenina, é uma proteína da membrana interna mitocondrial que dissipa o gradiente do próton mitocondrial (H^+) gerado pela cadeia respiratória, produzindo calor ao invés de ATP. Em roedores, o tecido adiposo marrom contribui para a manutenção da temperatura corporal por meio da termogênese. Foi demonstrado que, durante a aclimação ao frio, a capacidade dos adipócitos marrons de produzir calor é determinada pelo teor de UCP-1 de suas mitocôndrias (Boss; Muzzin; Giacobino, 1998; Erlanson-Albertsson, 2003; Rousset et al., 2004; Toda, 2014).

A atividade física aumenta os índices da biogênese mitocondrial no tecido adiposo e induzem elevações na expressão de mRNA da UCP-1. Foi demonstrado que camundongos que tiveram acesso a uma roda de corrida voluntária, um modelo de atividade física, estavam protegidos contra a inflamação induzida por LPS no fígado. A atividade física modula o complexo de ligação de LPS, ou seja, TLR4 e MyD88. Não houve diferenças na expressão de mRNA de TLR4, mas a atividade física gerou aumento no teor de proteína de MyD88. Esse efeito foi predominantemente evidente em 6 horas, em comparação com 12 horas após LPS, que é um período no qual níveis sistêmicos de fatores pró-inflamatórios atingem o nível máximo (Peppler et al., 2017).

A partir de 1995, outras isoformas de UCPs foram descritas: UCP-2 (presente em diversos órgãos e tipos de células) e UCP-3 (expressa principalmente em músculo esquelético).

Outro transportador mitocondrial mais distante de UCPs foi identificado e denominado UCP-4, presente em sistema nervoso central. Um transportador mitocondrial do cérebro, denominado BMCP1, também foi renomeado como UCP-5. A UCP-2 e a UCP-3 compartilham, respectivamente, 72% e 57% de identidade de aminoácidos em relação à UCP-1 (Boss et al., 1997; Rousset et al., 2004).

A UCP-2 está envolvida em mecanismos fisiológicos/patológicos de inflamação, distúrbio neurodegenerativo, câncer e síndrome metabólica (Boss; Muzzin; Giacobino, 1998; Rousset et al., 2004; Toda, 2014).

UCP-2 e UCP-3 estão presentes em menor abundância do que a UCP-1 e o desacoplamento com o qual estão associadas não é significativamente termogênico. O superóxido aumenta a condutância de prótons mitocondriais através dos efeitos sobre UCP-1, UCP-2 e UCP-3. A interação do superóxido com UCPs pode ser um mecanismo para redução das concentrações de espécies reativas de oxigênio dentro das mitocôndrias (Echtay et al., 2002; Brand; Esteves, 2005).

Diversas observações levaram à hipótese de que poderia haver proteínas desacopladoras em tecidos diferentes do tecido adiposo marrom: vazamentos de H^+ mitocondrial foram observados em tecidos desprovidos de UCP-1. Elas podem representar até 50% do consumo de oxigênio de alguns tecidos e até 30% da taxa metabólica de todo o organismo em ratos. A UCP-2 é expressa na maioria dos tecidos investigados em seres humanos e roedores, enquanto a UCP-3 é expressa principalmente no músculo esquelético em seres humanos e roedores, além de ter sido observada no tecido adiposo marrom em roedores. As três UCPs possuem cerca de 300 aminoácidos de comprimento e possuem uma massa molecular de 30 kDa. Cada uma das três UCPs possui três assinaturas típicas de proteínas de transferência de energia, que podem ser utilizadas para identificar transportadores mitocondriais a partir de sequências de aminoácidos. Diversas linhas de evidências indicam que a UCP-2 e a UCP-3 são proteínas desacopladoras reais (Boss; Muzzin; Giacobino, 1998).

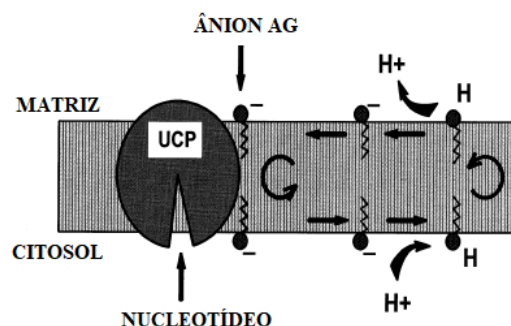
A molécula de UCP contém seis hélices hidrofóbicas α transmembrana, que são responsáveis por criar canal dentro da membrana interna. A função da UCP-1 é regulada por nucleotídeos de purina, ácidos graxos e fosforilação. Os nucleotídeos de purina, como GDP, se ligam diretamente à UCP-1 e causam sua inativação. Além disso, ácidos graxos livres (AGLs) promovem o vazamento de proteínas dependente de UCP-1. Foram propostos quatro diferentes modelos para o transporte de prótons dependente de UCP-1. No primeiro modelo (modelo de competição), AGLs competem com nucleotídeos de purina para se ligar à UCP-1 e assim

induzem o transporte de prótons. No segundo modelo, AGLs são diretamente utilizados pela UCP-1 como um cofator para uma via de transferência de prótons através da proteína. No terceiro modelo (modelo de ciclagem), AGLs são diretamente importados pela UCP-1 no espaço mitocondrial interno. Depois de protonados, os AGLs são capazes de voltar para a matriz mitocondrial ao cruzar a membrana mitocondrial interna em um mecanismo dependente da UCP-1. O quarto modelo, denominado modelo de transporte, AGLs protonados e desprotonados são diretamente transportados pela UCP-1 porém AGLs de cadeia longa não são capazes de atravessar totalmente pela UCP-1 em decorrência de sua hidrofobicidade, mas são capazes de “capturar” prótons e, assim, induzir o vazamento de prótons através da UCP-1. Foi sugerido que a atividade da UCP-2 poderia ser completamente bloqueada por GDP no estado basal e a mesma poderia então ser ativada somente em determinadas circunstâncias, como a entrada massiva de AGLs em mitocôndrias. A atividade desacopladora da UCP-3 poderia ser ativada somente em circunstâncias específicas, como a alta disponibilidade em AGLs (Boss; Muzzin; Giacobino, 1998; Pan; Wang; Liu, 2018; Demine; Renard; Arnould, 2019).

Segundo Ježek et al. (2018), a presença de UCPs em biomembranas não é suficiente para o desacoplamento; as UCPs realizam a mediação do desacoplamento induzido por ácidos graxos por movimento transbicamada (*flip-flop*) do ácido graxo protonado do lado citosólico para o lado da matriz da membrana interna, com retorno da forma aniônica para o lado citosólico.

As proteínas desacopladoras catalisam o fluxo de prótons eletroforéticos dependentes de ácidos graxos (AGs) na membrana interna de mitocôndrias. Presume-se que os prótons se movam através de uma via aquosa na UCP e que os grupos principais de AG estão alinhados ao longo da via como cofatores de carregamento que operam em conjunto com aminoácidos residentes condutores de H^+ , como as histidinas (Figura 5) (Garlid et al., 2000).

Figura 5-Ciclo protonofórico catalisado por UCP.



Fonte: Adaptado Garlid et al., 2020.

O esquema acima mostra um segmento de membrana interna que contém UCP. O ciclo de desacoplamento consiste em seis etapas: (i) partições de ânions de AG na bicamada lipídica com seu grupo principal no nível das ligações acil glicerol e abaixo da superfície dos grupos principais de fosfolipídios; (ii) o ânion de AG se difunde lateralmente na bicamada para alcançar um sítio de ligação ao substrato na UCP que é protegido da fase aquosa volumosa; (iii) a barreira de energia para o transporte de ânions de AG é rebaixada por um sítio de ligação fraco localizado na metade do caminho pela via de transporte da UCP (a preferência da UCP por ânions hidrofóbicos indica que a cauda de AG hidrofóbicos permanece na bicamada durante o transporte); (iv) o grupo carboxilato de AG se move para o outro lado da membrana por um mecanismo flip-flop, após se difunde lateralmente para longe da via de condutância; (v) o ânion de AG é protonado; (vi) o AG protonado passa por flip-flop de maneira rápida e espontânea, fornecendo prótons de forma eletroneutra para a matriz mitocondrial e concluindo o ciclo (Garlid et al., 2020).

As UCPs apresentam duas modalidades de transporte: na presença de ácidos graxos (AGs), elas catalisam o transporte eletroforético de prótons (uniporte de H⁺), que é a causa do desacoplamento mitocondrial e dissipação de energia. Elas também catalisam o transporte eletroforético de ânions seletivos, inclusive cloro e ânions hidrofóbicos. Nicholls (2006) revelou que a UCP-1 é capaz de conduzir prótons na ausência de ácidos graxos, eliminando a possibilidade de que os ácidos graxos exercem uma função obrigatória de ciclagem no mecanismo de translocação de prótons pela UCP-1. Entretanto, essa afirmação foi fundamentada em estudos realizados em mitocôndrias isoladas. Segundo Fedorenko, Lishko e Kirichok (2012), tais estudos não foram completamente fundamentados, uma vez que AGs são continuamente produzidos pela ação de fosfolipases que atuam sobre fosfolipídios da membrana. Assim, é necessário observar que a purificação e reconstituição em membranas artificiais são essenciais para uma caracterização funcional de uma proteína de transporte (Palmieri, 1994; Ježek et al., 2018).

A UCP-2 e a UCP-3 regulam o metabolismo de ácidos graxos. Sabe-se que a UCP-2 e a UCP-3 são expressas em diversos tipos de células que participam do metabolismo de ácidos graxos: músculo esquelético, células adiposas e macrófagos. A função da UCP-2 e da UCP-3 é de exportar ânions de ácidos graxos fora da matriz mitocondrial quando um excesso de ácidos graxos está dentro das mitocôndrias (Rousset et al., 2004).

As proteínas desacopladoras são capazes de promover o vazamento de prótons na membrana interna. Elas dispersam o gradiente de prótons mitocondrial pela translocação de H⁺

na membrana interna, com subsequente atividade respiratória e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ATP. A proteína desacopladora 2 (UCP-2) é expressa em múltiplos tipos de tecidos, como tecidos do sistema nervoso central, rim, coração, fígado, pâncreas, baço, timo e macrófagos. Diversos estudos revelaram que a UCP-2 está envolvida na regulação da inflamação, regulação do estresse oxidativo, manutenção de potencial da membrana mitocondrial e produção de energia, que podem estar relacionados à patofisiologia da sepse. UCP-2 em células sanguíneas pode ser um biomarcador para a sepse e o nível de UCP-2 está positivamente correlacionado com a intensidade da sepse. Foi constatado ainda que a função patológica da UCP-2 é específica do tecido e da doença. Os achados do estudo revelaram que o tratamento com LPS aumentou a expressão de UCP-2 *in vitro* e *in vivo*, concluindo que UCP-2 melhorou a disfunção mitocondrial, inibiu significativamente a liberação de fatores inflamatórios e a ativação de NF- κ B induzida por LPS, além de ter reduzido o estresse oxidativo ao suprimir a geração de ROS na lesão renal aguda induzida por lipopolissacarídeos (Cadena, 2018; Pan; Wang; Liu, 2018).

Em repouso, o consumo de energia é baixo e a disponibilidade de ADP para a respiração por fosforilação diminui, podendo resultar em um aumento dos níveis intracelulares de oxigênio, além de aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio, causando danos oxidativos dentro da célula. A respiração mitocondrial não fosforilada (desacoplada) permite a manutenção de níveis baixos de O₂ e de ROS quando a respiração fosforilada não é capaz de fazer isso em decorrência de falta de ADP. A UCP-2 tem como função a regulação da geração de peróxido de hidrogênio mitocondrial, corroborando uma função da UCP-2 no controle de processos celulares que envolvem radicais livres gerados por mitocôndrias, como dano oxidativo, inflamação ou apoptose (Boss; Muzzin; Giacobino, 1998; Rousset et al., 2004).

A UCP-2 e UCP-3 são 73% homólogas entre si e 58% homólogas à UCP-1. A UCP-2 e UCP-3 são reconhecidas como uma alça de feedback negativo para a emissão de ROS mitocondriais. A ativação da UCP-1 pode aumentar a produção de ROS mitocondriais e, por isso, existem mecanismos divergentes de controle para a UCP-1; isso pode estar relacionado às funções fisiológicas distintas do tecido adiposo marrom. Foi demonstrado que a UCP-3 intensifica o metabolismo de ácidos graxos em camundongos. A atividade desacopladora da UCP-2 pode representar um regulador negativo da secreção de insulina estimulada por glicose em células beta pancreáticas ao reduzir a PMF mitocondrial e diminuir a emissão de ROS,

enquanto a UCP-3 demonstrou aumentar a sensibilidade à insulina e promover o metabolismo oxidativo de glicose (Mailloux; Harper, 2012).

A grande maioria das ROS é gerada como subproduto da atividade da cadeia respiratória mitocondrial. Estima-se que pelo menos 0,2% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias seja convertido em ROS. Logo, a produção de ROS está correlacionada ao metabolismo mitocondrial, do qual NADH e acetil CoA são os compostos centrais. As espécies reativas de oxigênio apresentam a capacidade de causar danos oxidativos às proteínas, DNA e lipídios. ROS podem comprometer o mtDNA, o qual está positivamente correlacionado com a expressão de múltiplas proteínas associadas à biogênese mitocondrial, como PGC-1 α , NRF1, NRF2 e TFAM. Sabe-se que a respiração celular está associada à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), uma vez que a molécula de oxigênio é capaz de aceitar um elétron para criar um íon superóxido, uma forma mais reativa de oxigênio. As mitocôndrias são capazes de produzir ROS, evento que está associado à atividade dos complexos respiratórios I e III e com a ubi-semiquinona gerada no curso das reações de transporte de elétrons na cadeia respiratória. Sabe-se que o desacoplamento leve da respiração diminui a formação de ROS mitocondriais pelos complexos I e III. A explicação para o controle da produção de ROS pelo desacoplamento da respiração é que a formação de ROS depende do gradiente de prótons mitocondriais e do potencial mitocondrial. Ácidos graxos podem evitar um aumento no gradiente eletroquímico mitocondrial e, assim, reduzir a geração de ROS. Assim, um desacoplamento leve da respiração pode participar da defesa antioxidante e as UCPs podem ser os efetores desse mecanismo de defesa (Rousset et al., 2004; Pecqueur et al., 2008).

ROS são um dos fatores que causam apoptose hepatocelular em lesão hepática endotóxêmica. Ao translocar peróxidos de ácidos graxos da membrana interna para a membrana externa da mitocôndria, a UCP-2 reduz a produção de ROS durante a respiração mitocondrial. O aumento da atividade de UCP-2 desacopla a fosforilação oxidativa, reduzindo a eficácia da síntese de ATP, podendo intensificar a necrose de hepatócitos (Le Minh et al., 2009).

A glutationilação de proteínas mitocondriais surgiu como um mecanismo para o controle da produção de ROS. O processo de glutationilação envolve a formação de uma ligação dissulfeto entre um grupo tiol glutationa (GSH) e um tiol cisteína disponível de uma proteína. A (des)glutinationilação modula a sinalização celular, eventos de ciclo celular, polimerização de actina e metabolismo mitocondrial em resposta a fatores de crescimento, alterações na oxidação de substrato ou alterações nos níveis de ROS. Há proteínas que sofrem glutationilação, entre essas estão as enzimas do ciclo de TCA, proteínas da cadeia respiratória (no complexo I e ATP

sintase) e outras proteínas da membrana mitocondrial interna (ANT, UCP-2 e UCP-3). O estado de glutationilação dessas proteínas muda de acordo com alterações nos níveis de ROS: níveis elevados resultam no estado de glutationilação dessas proteínas e desativação de enzimas do ciclo de TCA, complexo I e ATP sintase. Em contrapartida, elevações discretas em ROS realizam a desglutinationilação e ativam o succinato desidrogenase, UCP-2 e UCP-3. O aumento de ROS demonstrou ativar o vazamento de prótons através dessas UCPs, que inibem, então, a produção subsequente de ROS. O vazamento de prótons associado a UCPs 1-3 é ativado por ROS ou outros subprodutos de lipídios, como 4-HNE; isso indica que ROS mitocondriais são autorreguladas por meio da dissipação de PMF. Foi constatado que pequenas quantidades de ROS (atóxicas) ativam o vazamento de prótons por meio da UCP-2 e UCP-3 por meio da desglutinationilação. Quantidades mais elevadas de ROS, que induziram o estresse oxidativo, não ativaram essas proteínas. Em contrapartida, a glutationilação dessas proteínas desativa o vazamento. Devido à função de sinalização de ROS mitocondriais, a ativação/desativação do vazamento por meio de UCP-2 e UCP-3 poderia desempenhar uma função significativa na sinalização celular e na patofisiologia de tecidos (Mailloux; Harper, 2012).

A proteína desacopladora 2 (UCP-2) é uma proteína da membrana mitocondrial interna que desempenha função na redução do potencial da membrana mitocondrial e na dissipação de energia metabólica, prevenindo o estresse oxidativo. Estudos comprovaram que a expressão da UCP-2 foi regulada positivamente no coração, fígado, músculo esquelético e outros tecidos no modelo de sepse. Como um biomarcador da avaliação da função mitocondrial, a UCP-2 tem potencial de auxiliar no diagnóstico da sepse. O estudo revelou que uma elevação do nível sérico da UCP-2 poderia indicar a presença de lesão mitocondrial. Os motivos para a elevação do nível sérico de UCP-2 podem ser considerados: a superexpressão da UCP-2 durante o estágio inicial da sepse, a expressão gênica e a produção de UCP-2 apresentaram uma correlação positiva com a gravidade da sepse, o dano ultraestrutural mitocondrial persistente devido ao agravamento da sepse, as células apresentam apoptose, o que leva à liberação contínua da UCP-2 na circulação (Huang et al., 2020).

A proteína desacopladora 2 (UCP-2) desempenha função de regular o gradiente de prótons da membrana mitocondrial interna e externa e estabelecer uma ponte entre a geração de ATP e de ROS. A UCP-2 atenua a geração de ROS para proteger as células do dano induzido por estresse oxidativo. Os astrócitos submetidos a um modelo *in vitro* de encefalopatia associada à sepse (EAS) induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e interferon (IFN)- γ exibiram aumento da expressão de mRNA da UCP-2, alcançando um pico em 24 horas após o estímulo.

Quando astrócitos com redução da expressão de UCP-2 foram estimulados por LPS+IFN- γ , foi observado aumento na expressão de marcadores pró-inflamatórios e no dano à ultraestrutura mitocondrial. A redução no potencial de membrana mitocondrial (MMP) está intimamente relacionada ao dano celular. A UCP-2 regula a concentração de prótons das membranas mitocondriais e, portanto, está fortemente associada ao MMP. No estudo, o estímulo com LPS+IFN- γ levou a uma redução do MMP no modelo experimental de sepse e a redução da expressão de UCP-2 agravou o dano mitocondrial. A UCP-2 dissocia a oxidação e a fosforilação em mitocôndrias ao reduzir a diferença da concentração de prótons em ambos os lados da membrana mitocondrial interna e a síntese de ATP. O estudo constatou que a sepse gerou níveis baixos de ATP, enquanto o silenciamento da UCP-2 recuperou os níveis de ATP. A redução da expressão da UCP-2 agravou a destruição da ultraestrutura mitocondrial, causou edema grave e dano à membrana mitocondrial interna (Peng et al., 2019).

As ROS estão elevadas em alguns processos patológicos, incluindo cardiomiopatia induzida por sepse e lesão de reperfusão cardíaca. A UCP-2 desempenha uma função protetora no coração por meio de seu *looping* de realimentação negativa em condições de sepse. Para o coração, a modulação do nível de UCP-2 é aparentemente aumentada no status de estresse oxidativo. O desacoplamento da fosforilação oxidativa diminui a formação de superóxido pelo complexo I. Além disso, substâncias desacopladoras podem inibir a formação de superóxido pelos complexos I e III em virtude de sua capacidade antioxidante. A regulação positiva de UCP-2 atenuou a geração de ROS e evitou a sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, suprimindo os marcadores de morte celular (Akhmedov; Rybin; Marín-García, 2015; Pan; Wang; Liu, 2018).

Uma característica importante da UCP-2 é que ela é expressa em quase todos os tipos de células e, assim, poderia ser candidata para o mecanismo da condutância de prótons basal onipresente. Essa interpretação foi revisada: o mRNA da UCP-2 originalmente localizado no fígado demonstrou estar presente somente nas células de Kupffer e não em hepatócitos. Em condições normais, níveis muito baixos de mRNA da UCP-2 são mensuráveis em hepatócitos (Stuart et al., 1999).

Duas isoformas, UCP-2 e UCP-3, estão localizadas no tecido cardíaco. O estudo revelou que as UCPs mitocondriais estão presentes no coração de seres humanos, e que os valores da UCP se correlacionam positivamente com concentrações de ácidos graxos livres no plasma em jejum (Murray et al., 2004).

A UCP-3 é expressa principalmente no músculo esquelético, mas também é encontrada no tecido cardíaco. A literatura mostrou que a UCP-3 também desempenha papéis

regulatórios importantes na oxidação de ácidos graxos mitocondriais e na proteção contra danos oxidativos induzidos por ROS mitocondriais. Sabe-se que ROS ou seus subprodutos podem induzir a ativação do desacoplamento pela UCP-3 que fornece um ciclo de feedback negativo para a produção de ROS mitocondrial (Busiello; Savarese; Lombardi, 2015).

A proteína desacopladora 3 é expressa em níveis elevados no músculo esquelético, no tecido adiposo marrom e, em menor grau, no coração, no tecido adiposo branco e em alguns tipos específicos de neurônios. A UCP-3 geralmente não é expressa no fígado, porém níveis elevados de expressão da UCP-3 no fígado ocorrem em situações de catabolismo intensificado de ácidos graxos, como por exemplo, em uma dieta com alto teor de gordura. Os mecanismos moleculares que suportam a supressão da expressão da UCP-3 em hepatócitos, no entanto, são evitados somente por tratamentos que envolvem a alta disponibilidade de ácidos graxos e uma alta oxidação de lipídios no fígado. A UCP-3 apresenta como função o favorecimento da oxidação e/ou do transporte de ácidos graxos, e uma função na proteção de células contra uma produção elevada de espécies reativas de oxigênio. Situações de metabolismo lipídico forçado no fígado, nas quais a expressão da UCP-3 é induzida, são conhecidas por serem possivelmente nocivas para os hepatócitos, podendo levar desde esteatose hepática e estresse oxidativo até o desenvolvimento de insuficiência hepática. Assim, a expressão de UCP-3 no fígado pode ser uma reação fisiológica para proteger células hepáticas contra o dano metabólico nessas situações (Camara et al., 2009).

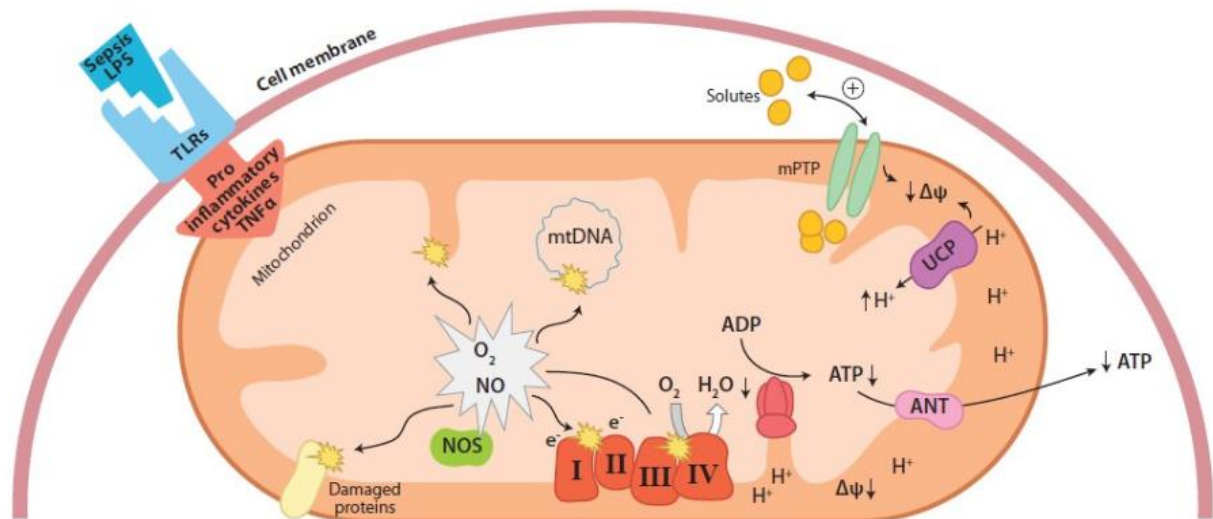
Considerando que as UCPs contribuem para a condutância basal de prótons das mitocôndrias e sabendo que a condutância basal é positivamente regulada por hormônios da tireoide, foi analisado o efeito do status da tireoide sobre o nível de expressão da UCP-2 e da UCP-3. Nesse sentido, a expressão da UCP-3 foi significativamente ativada em animais com hipertireoidismo (Rousset et al., 2004).

As UCPs formam uma família de proteínas que pertencem ao grupo dos transportadores mitocondriais de ânions. A UCP-1 funciona como um desacoplador em adipócitos marrons e sua função é criar um desacoplamento da respiração ativado por ácidos graxos e regular a termogênese. O vazamento de prótons através da UCP-1 desacopla a oxidação do substrato da fosforilação do ADP em ATP, levando ao rápido consumo de oxigênio e produção de calor. UCP-2 e UCP-3 podem facilitar a adaptação de células a moléculas de oxigênio por meio de um desacoplamento leve da respiração, restringindo assim a produção de ROS. As proteínas desacopladoras apresentam outras funções, incluindo mediação da oxidação de ácidos graxos e exportação de ácidos graxos (Rousset et al., 2004; Brand; Esteves, 2005;

Busiello; Savarese; Lombardi, 2015). Assim, uma compreensão dos processos mitocondriais que levam ao desacoplamento (Figura 6) pode fornecer um alvo terapêutico para patologias envolvidas com desequilíbrio metabólico, tais como a sepse.

Figura 6-Efeito da sepse sobre a fosforilação oxidativa e desacoplamento mitocondrial.

A interação entre lipopolissacarídeo (LPS) e receptores tipo *toll* (TLRs) induz citocinas pró-inflamatórias e desencadeia a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). O aumento na produção de ROS e NO causa danos a componentes de ETC e na ATP sintase e induz uma perda do potencial de membrana através da ativação de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP). A ativação da UCP2 dissipa a produção de ROS, mas não é suficientemente potente para evitar o desacoplamento da fosforilação oxidativa.



Fonte: Eyenga et al., 2022.

3 HIPÓTESES

- I. A tolerância reduziria o desacoplamento mitocondrial que ocorre na sepse;
- II. A indução da tolerância ao lipopolissacarídeo predisporia ao aumento do mtDNA em hepatócitos;
- III. A tolerância manteria a respiração mitocondrial durante a sepse.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

O presente trabalho teve por objetivo estudar os efeitos da tolerância ao LPS no desacoplamento mitocondrial em modelo experimental de sepse através de ligadura e punção cecal (CLP), além de avaliar o dano mitocondrial através da quantidade de mitocôndrias presente no tecido hepático e estudar o consumo de oxigênio em preparações mitocondriais de tecido hepático de animais tolerantes ao LPS.

4.2 Específicos

- I. Verificar se a sepse altera a quantidade de UCP-1, UCP-2 e UCP-3;
- II. Verificar o efeito da tolerância ao LPS sobre a quantidade de UCP-1, UCP-2 e UCP-3;
- III. Verificar se a indução da tolerância ao lipopolissacarídeo aumenta a quantidade de mitocôndrias;
- IV. Verificar se tolerância ao LPS induz maior taxa de respiração celular;
- V. Verificar se a tolerância ao LPS reduz o desacoplamento mitocondrial.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Modelo biológico

No estudo, foram selecionados camundongos da linhagem Balb/c, machos, pesando entre 20 e 27 gramas, de 7 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos durante o estudo no Biotério da Clínica Médica do 3º andar da Faculdade por um período de no mínimo dois dias antes de serem utilizados nos experimentos. Foi seguida a normatização: ração CR1-NUVILAB e água filtrada *ad libitum*, com ciclo 12 horas/12 horas claro/escuro, que regulamenta a utilização, manutenção e descarte dos animais. 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). O projeto recebeu a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq). Protocolo de Pesquisa número 1097/2018.

5.2 Constituição dos Grupos

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Controle, Tolerante, CLP e CLP Tolerante. Foi feita a separação da seguinte maneira, sendo cada grupo constituído por dez animais:

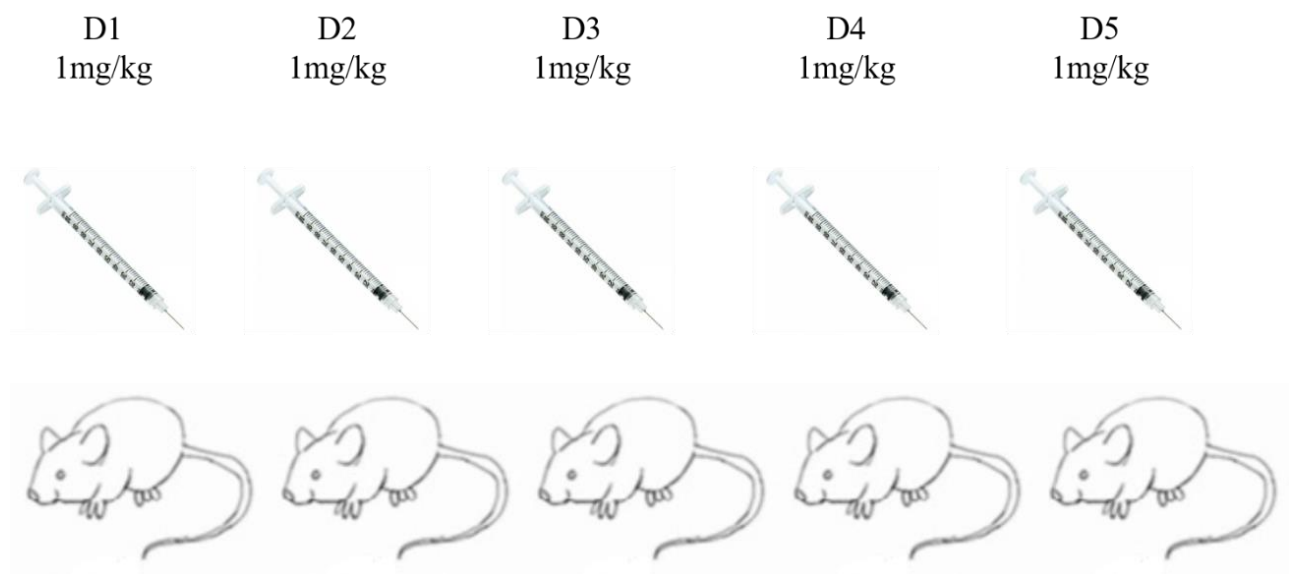
5.2.1 Grupo Controle (C)

Os camundongos não receberam nenhum tipo de insulto, nenhuma dose de LPS e nenhum tratamento.

5.2.2 Grupo Tolerante (Tol)

Os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (sorotype 026:B6/Sigma-Aldrich), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias (Figura 7).

Figura 7- Indução de tolerância.



Fonte: Produção do próprio autor, 2022.

5.2.3 Grupo CLP Naive

Os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP), não recebendo nenhuma dose de LPS. Os animais foram eutanasiados 24 horas após o procedimento e foi realizada a coleta do material.

5.2.4 Grupo CLP Tolerante (CLPT)

Os camundongos receberam 5 doses prévias de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (sorotype 026:B6/Sigma-Aldrich), com administrações intraperitoneais diárias

de 1mg/kg de LPS durante 5 dias, permaneceram 2 dias em repouso sem receber nenhum tratamento e no dia 8 foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). Os animais foram eutanasiados 24 horas após o procedimento e foi realizada a coleta do material.

5.3 Anestesia

Para a realização do procedimento de ligadura cecal (*Cecal Ligation and Puncture*) para indução à sepse e tolerância, os animais foram anestesiados com associação de Quetamina (80mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) administrados intraperitonealmente. Para analgesia, foi administrado dipirona (8,3mg/kg), *ter in die*, no período pós-operatório. Os descartes dos animais foram realizados de acordo com a Cartilha de Orientação para Descarte de Resíduo no Sistema FMUSP-HC, conforme as normas do CEP FMUSP.

5.4 Ligadura cecal e perfuração para indução a sepse

A indução da sepse nesse estudo foi realizada pelo método de sepse abdominal por peritonite fecal, denominado ligadura e perfuração cecal (CLP, em inglês, *Cecal ligation and puncture*), conforme descrito por Soriano et al. (2002). Sob condições assépticas, após anestesia, uma incisão mediana de 1 cm na linha alba foi realizada para permitir a exposição do ceco. Posteriormente, foi realizada a ligadura firme do ceco com fio de algodão 3-0 (Ethicon; Johnson & Johnson, EUA) abaixo da válvula ileocecal. Após a ligadura, o ceco foi perfurado três vezes (na porção superior e inferior) com uma agulha de calibre 22 G gauge (Becton Dickinson, EUA). O ceco foi então cuidadosamente comprimido com a finalidade de expulsar uma pequena quantidade de conteúdo fecal a partir dos locais de perfuração e então foi retornado para a cavidade peritoneal e realizada a laparotomia com fio de nylon 4-0. Os animais foram devolvidos às suas gaiolas com livre acesso a água e comida.

5.5 Curva de sobrevivência

Foi realizada curva de sobrevivência com o objetivo de padronização da técnica de ligadura cecal (CLP) e perfuração para indução a sepse. Foram utilizados 20 animais para o grupo CLP e 20 animais para o grupo CLP Tolerante. Os animais foram observados por 96 horas.

5.6 Quantificação das UCPS

A quantificação das proteínas desacopladoras UCP-1, UCP-2 e UCP-3 foi realizada através de ELISA com a técnica de imunoenensaio enzimático sanduíche quantitativo (Elisa Kit *MyBiosource*®: MBS933377, MBS7234483, MBS7222741). O anticorpo específico para cada UCP foi pré-aderido em uma microplaca e, então, padrões e amostras foram pipetadas nos poços e qualquer UCP presente era ligada pelo anticorpo imobilizado. Após a remoção de substâncias que não foram ligadas, um anticorpo conjugado à biotina específico para cada UCP foi adicionado aos poços. Após a lavagem, Peroxidase de Rábano (HRP) conjugada à avidina foi adicionada aos poços. A amostra e o tampão do ensaio foram incubados juntamente com o conjugado de UCP-HRP em placa pré-revestida durante uma hora. Após o período de incubação, os poços foram decantados e lavados cinco vezes.

Após a lavagem para remover qualquer reagente enzimático não ligado à avidina, uma solução de substrato foi adicionada aos poços e assim a cor se desenvolveu proporcionalmente à quantidade de UCP ligada na etapa inicial. O produto da reação enzima-substrato formou um complexo de cor azul. Por fim, uma *stop solution* foi adicionada para interromper a reação, que então tornou a solução amarela. A intensidade da cor foi mensurada através de densidade óptica/espectrofotometria após 5 minutos, utilizando-se um leitor de microplacas ajustado para 450 nm em um leitor de microplaca.

A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de UCP, uma vez que a UCP das amostras e o conjugado de UCP-HRP competem pelo sítio de ligação do anticorpo anti-UCP. Como o número de sítios é limitado, conforme mais sítios são ocupados pela UCP proveniente da amostra, menos sítios restam para ligação ao conjugado de UCP-HRP. Uma curva padrão foi gerada, relacionando a intensidade da cor (densidade óptica) com a

concentração dos padrões. A concentração da UCP em cada amostra é interpolada a partir dessa curva padrão.

5.7 Quantificação de mtDNA

A quantidade relativa de mitocôndrias no fígado de camundongos foi obtida através de métodos quantitativos de PCR em tempo real (RT-PCR) descritos por Wong e Cortopassi (2010). Os genes alvo foram o da nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase 5-mitocondrial (ND-5) e o da fibrose cística nuclear (CF). Foi utilizado o *Primer Express Software*® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para a realização da quantificação de DNA nuclear, foi utilizado 10 ng de DNA e para quantificação de DNA mitocondrial, foi utilizado 0,1 ng de DNA.

Para a extração de DNA do tecido hepático, foi utilizado o Kit Qiagen. Foram separados microfragmentos de tecido hepático (cerca de 10 miligramas) em um tubo, onde foi acrescentado 180 microlitros de buffer ATL e após 20 microlitros de Proteinase K. Assim, tal amostra foi mantida em banho seco a 56°C durante três horas, sendo homogeneizado a cada trinta minutos. Após o banho seco, foi acrescentado 200 microlitros de Etanol absoluto e o conteúdo transferido para cada coluna contida no Kit. Após, foi realizada a centrifugação por dois minutos, acrescentado 500 microlitros de Buffer AW1 e realizada nova centrifugação durante dois minutos, sendo então acrescentado 500 microlitros de Buffer AW2 para nova centrifugação durante quatro minutos. Por fim, foi acrescentado 100 microlitros de Buffer AE, mantido um minuto em temperatura ambiente e após foi realizada a centrifugação durante dois minutos, sendo extraído então o DNA de cada amostra analisada, o qual foi quantificado no Aparelho Nanowue. Foi feita a diluição do DNA com água deionizada estéril: para amplificar o gene nuclear (CF), foi realizada a diluição do DNA a 10 nanogramas e para amplificação do gene mitocondrial (ND-5), foi feita a diluição a 0,1 nanogramas.

Foi utilizado um termociclador em tempo real ABI 7900HT acoplado com SYBR Green (Applied Biosystems). A linearidade da curva de amplificação foi estudada utilizando o ABI 7900HT Software, sendo que cada amostra foi analisada em duplicata.

5.8 Avaliação do metabolismo mitocondrial em tecido hepático submetido à tolerância: isolamento de mitocôndrias e avaliação do consumo de oxigênio

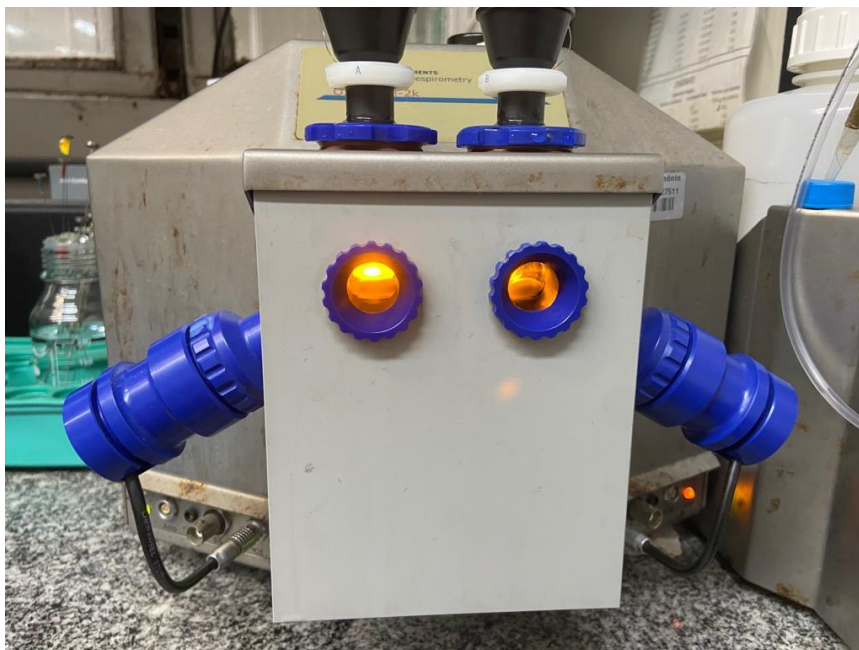
5.8.1 Isolamento de mitocôndrias

Após indução da sepse e eutanásia dos animais dos quatro grupos, foi realizado o isolamento mitocondrial e para tal, o fígado foi extraído imediatamente e homogeneizado em tampão de isolamento, contendo 300 mM de Sucrose, 10 mM de Hepes, 2 mM de EGTA, pH 7,2; e as mitocôndrias foram isoladas por centrifugação em gradiente de sacarose. Em suma, o homogenato foi centrifugado a 800g durante 5 minutos (4°C). O pelete foi descartado e o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 10.000g por 10 minutos (4°C) para separar a fração citosólica da fração mitocondrial. O sobrenadante resultante foi considerado como a fração citosólica e foi descartado. O pelete resultante foi ressuspensionado e considerado como a fração mitocondrial, que foi centrifugada a 10.000g durante 10 minutos (4°C) para remover resíduos citosólicos. Após, o pelete foi ressuspensionado no tampão de isolamento. Foi realizada então a diluição das amostras para o ensaio de Bradford.

5.8.2 Avaliação do consumo de oxigênio

Para caracterizar o metabolismo mitocondrial, avaliou-se o consumo de oxigênio na fração mitocondrial isolada do fígado dos animais, conforme previamente demonstrado por Ferreira et al. (2007). Para tais ensaios, foi utilizada a concentração final de proteína de 0,125 mg/ml, dosada através do ensaio de Bradford. As frações mitocôndrias hepáticas foram diluídas em tampão de KCl (Sacarose 125mM, KCL 65mM, Hepes 10mM, KH₂PO₄ 2mM, MgCl₂ 2mM, 0,01% BSA, 100uM EGTA, pH 7,2) para uma concentração final de proteína de 0,125 mcg/ml. Foi avaliado o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas por respirometria de alta resolução em oxígrafo Oroboros (OROBOROS Oxygraph-2k, Innsbruck, Austria). Para garantir a confiabilidade dos dados, o equipamento foi lavado e calibrado antes de cada ensaio com o meio de reação a ser utilizado. Utilizou-se um eletrodo específico de oxigênio, do tipo Clark, acoplado ao registrador Oroboros (Figura 8).

Figura 8- Equipamento Oroboros.



Fonte: Produção do próprio autor, 2022.

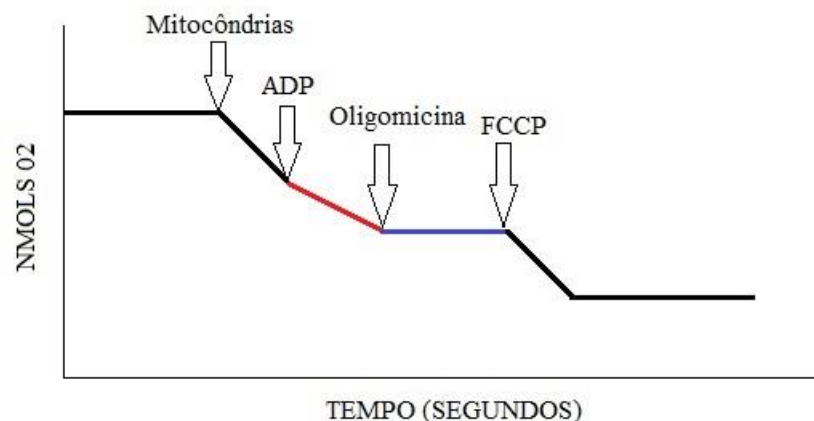
O Oroboros O2K é um dispositivo modular, que consiste em 2 câmaras de vidro de 2 mL, isoladas e autônomas, com uma barra de agitação magnética. O O2K é capaz de medir a respiração mitocondrial em tempo real em uma ampla variedade de preparos, em meio de suspensão. Um dos pontos fortes do O2K é a capacidade de realizar uma variedade de titulações com uma combinação de substrato-desacoplador-inibidores, que servem como indicadores sensíveis de resposta ao estresse mitocondrial, denominado protocolo de titulações de substrato-desacoplador-inibidor (SUIT), que permite o estudo de interações complexas de acoplamento e controle de substratos em um único ensaio, podendo ser utilizado para avaliar a resposta mitocondrial a processos de doença, como sepse ou choque hemorrágico. Uma das limitações do O2K é a presença de somente duas câmaras (Jang et al., 2017).

O eletrodo é composto por um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos em solução eletrolítica de KCl. A reação é processada pela corrente gerada entre os eletrodos, sendo relacionada à concentração de oxigênio na superfície do cátodo. Os registros de consumo de oxigênio foram realizados na presença de succinato (2mM), malato, glutamato (2mM) e ADP (1mM). Após a introdução da amostra de mitocôndria, foi adicionado ADP para estimular a produção de ATP. Um inibidor do complexo V (Oligomicina 1µg/ml) foi adicionado para bloquear sua atividade durante o ensaio. Além disso, utilizou-se um desacoplador da membrana

interna mitocondrial (FCCP – *Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*, 1 μ M) para estimular o consumo máximo de oxigênio (Figura 9). Os valores foram expressos em micromoles por minuto por miligrama de proteína. Esses procedimentos foram realizados em colaboração com o laboratório de Integração de Sistemas Biológicos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-III) da Universidade de São Paulo.

Figura 9-Esquema ilustrativo do procedimento utilizado na medida do consumo de oxigênio em mitocôndria isolada de tecido hepático.

Foi realizada a medida basal após adição de mitocôndria e substratos (succinato, malato, glutamato). Após tal medida, avaliou-se o consumo máximo de oxigênio induzido pela adição de ADP. Posteriormente, mediu-se o consumo de oxigênio na presença de oligomicina (inibidor do complexo V). Por fim, avaliou-se o consumo de oxigênio após adição de FCCP (desacoplador mitocondrial). Vale lembrar que a redução dos níveis de oxigênio na câmara é inversamente proporcional ao consumo de oxigênio mitocondrial.



Fonte: Produção do próprio autor, 2022.

A oligomicina liga-se à porção F_o do complexo F_1F_o ATP sintase, impedindo a síntese de ATP, pois impede o retorno de prótons a matriz mitocondrial. Dessa forma, o potencial elétrico de membrana ($\Delta\Psi_m$) será máximo e o consumo de oxigênio mínimo, ocorrendo apenas em resposta ao vazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna para a matriz. Uma vez na matriz mitocondrial, o FCCP se desprotona e, assim, o gradiente eletroquímico de prótons se desfaz. Em resposta, o transporte de elétrons ocorre em velocidade máxima e a ATPsintase

passa a atuar como ATPase, hidrolisando o ATP, na tentativa de restabelecer o gradiente eletroquímico de prótons.

A razão do controle respiratório (RCR) foi considerada como índice da função oxidativa e fosforilativa mitocondrial. A RCR foi calculada como razão entre a velocidade do consumo de oxigênio na presença de ADP (Estado 3) e a velocidade do consumo de oxigênio na ausência de ADP (Estado 4).

5.9 Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística, foi utilizada análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer (*software GraphPad Prism 5[®]*). As diferenças foram consideradas significativas para os grupos que obtiveram o nível de $p < 0,05$ (5%).

A curva de sobrevivência foi realizada através do método *Kaplan Meyer*, com análises estatísticas pelo *Log-rank (Mantel-Cox) Test* e *Gehan-Breslow-Wilcoxon Test*.

6 RESULTADOS

6.1 Curva de sobrevivência

Foi realizada uma curva de sobrevivência (Gráfico 1) dos animais submetidos à CLP naive e tolerantes. Esse experimento comparou os grupos CLP e CLPT e faz-se necessária para padronização da técnica de CLP. A curva de sobrevivência dos animais submetidos à CLP mostra que induzimos uma sepse com alta mortalidade do grupo CLP.

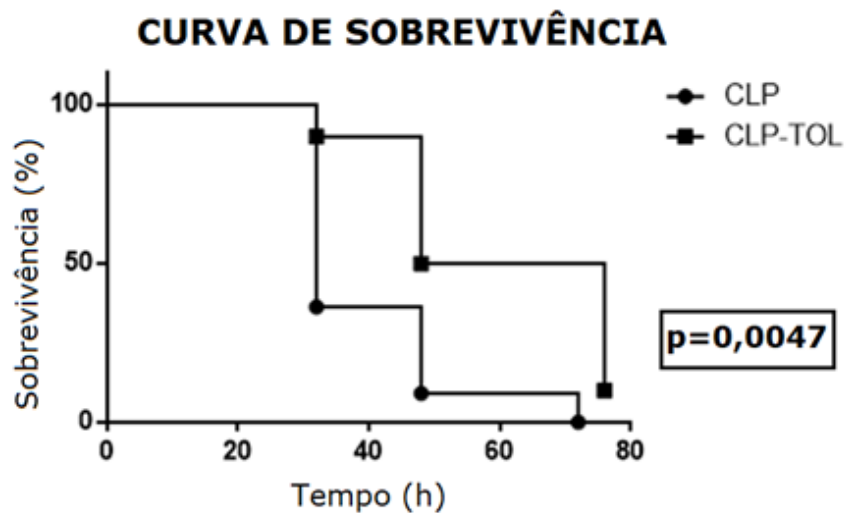


Gráfico 1- Papel da tolerância na sobrevivência dos animais submetidos a CLP (n=20 em cada grupo). No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP), não recebendo nenhuma dose de LPS. No grupo CLPT, os camundongos receberam 5 doses prévias de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias, permaneceram 2 dias em repouso e no oitavo dia foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). Após a realização da indução de tolerância e da CLP, os animais foram observados por 96 horas. A mortalidade foi observada a cada 12 horas. Não houve mortalidade após 96 horas no grupo CLPT. * $p < 0,05$, *Log-Rank Test*.

Observamos que o grupo CLP tolerante apresentou retardo na mortalidade em relação ao grupo CLP e, ao final do período analisado, houve diferença entre os dois grupos. Os dados obtidos demonstraram que 40% dos animais do grupo CLP permaneceram vivos durante 30

horas após procedimento, enquanto 90% dos animais do grupo CLP tolerante permaneceram vivos. Os resultados revelaram ainda que após 48 horas do procedimento de CLP, 50% dos animais do grupo CLP tolerante permaneceram vivos, porém apenas 10% do grupo CLP sobreviveram com o mesmo intervalo de tempo observado. Finalmente, com 72 horas, observou-se que nenhum animal do grupo CLP permaneceu vivo, porém 10% dos animais do grupo CLP tolerante sobreviveram durante 96 horas. A comparação das duas curvas pelo método de *Log-rank test* demonstrou significativa redução da mortalidade no grupo tolerante em relação ao grupo CLP.

6.2 Proteínas desacopladoras

6.2.1 Quantificação da proteína desacopladora 1 (UCP-1) em tecido adiposo marrom

Foi realizada a quantificação de UCP-1 em tecido adiposo marrom (Am) de animais Controle, animais Tolerante, animais CLP, animais CLP Tolerante (CLPT), eutanasiados 24 horas após o procedimento (Gráfico 2). Foi observado um aumento de UCP-1 de animais submetidos a CLP e a tolerância não foi efetiva em modificar a resposta dos animais.

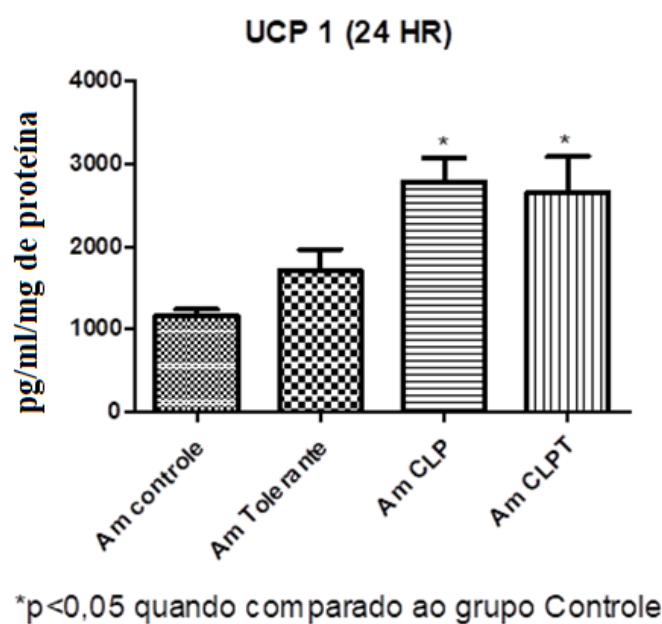


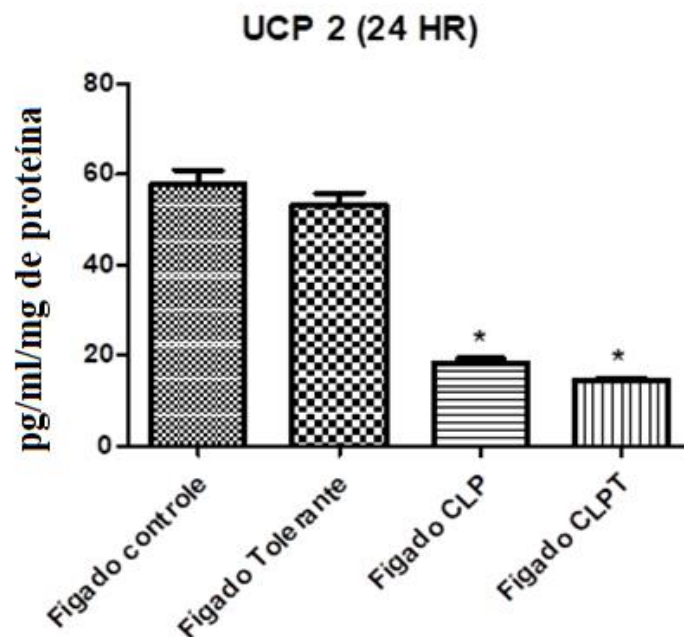
Gráfico 2- Quantificação de UCP-1 em tecido adiposo marrom (Am) de animais submetidos a CLP: papel da tolerância. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5

doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. Houve aumento de UCP-1 no tecido adiposo marrom dos animais submetidos a CLP e em animais tolerantes submetidos a CLP comparados ao grupo Controle (n=10 em cada grupo). *p<0,05.

Após os resultados, foi demonstrado que houve diferença significativa entre os grupos CLP e CLPT comparados ao grupo Controle. Ainda que a diferença seja significativa somente com o grupo Controle, há uma elevação dos níveis de UCP-1 em ambos os grupos que passaram pelo procedimento de CLP. Pode-se então constatar que no tempo de estudo analisado, os níveis de UCP-1 aumentam quando há um estímulo pró-inflamatório, seja ele causado pela tolerância, seja causado pela CLP.

6.2.2 Quantificação da proteína desacopladora 2 (UCP-2) em fígado

Outra etapa do estudo foi a quantificação de UCP-2 em fígado de animais Controle, animais Tolerante, animais CLP, animais CLP Tolerante (CLPT), eutanasiados 24 horas após o procedimento (Gráfico 3). Foi observada redução de UCP-2 no fígado de animais submetidos a CLP e a tolerância não foi efetiva em alterar a resposta dos animais.



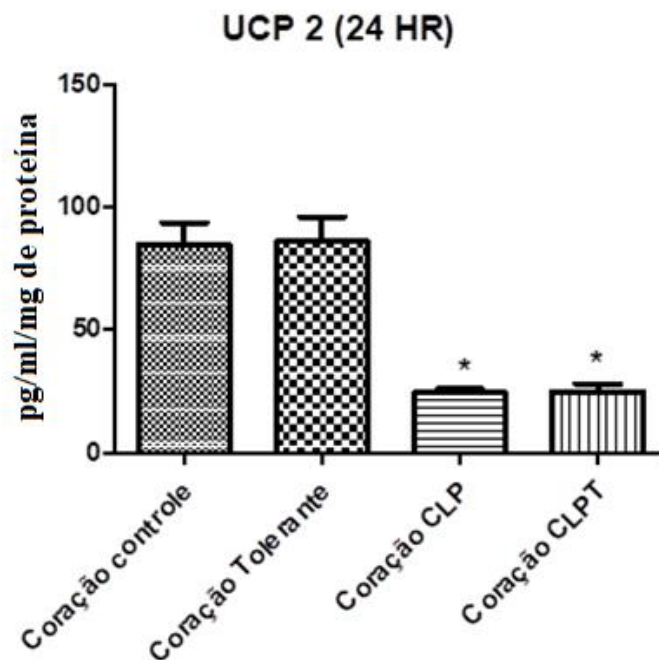
***p<0,05 quando comparado aos grupos Controle e Tolerante**

Gráfico 3-Quantificação de UCP-2 em fígado de animais submetidos a CLP: papel da tolerância. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. Os resultados observados demonstraram que houve redução de UCP-2 nos animais submetidos a CLP e em animais tolerantes submetidos a CLP quando comparados aos grupos Controle e Tolerante. No entanto, não foi observada diferença estatística nos animais tolerantes não sépticos quando comparados ao grupo Controle. n=10 em cada grupo. *p<0,05.

O comportamento da UCP-2 é antagônico ao comportamento da UCP-1. O estímulo pró-inflamatório causado pela CLP reduziu os níveis de UCP-2 no tecido hepático, dado o tempo em estudo. Não foi verificado, entretanto, influência da tolerância nessa categoria de proteína desacopladora.

6.2.3 Quantificação da proteína desacopladora 2 (UCP-2) em coração

Para complementar os dados da seção anterior, foi realizada a quantificação de UCP-2 em coração de animais Controle, animais Tolerante, animais CLP, animais CLP Tolerante (CLPT), eutanasiados 24 horas após o procedimento (Gráfico 4). Foi observada redução de UCP-2 no coração de animais submetidos a CLP e a tolerância não foi efetiva em modificar a resposta dos animais.



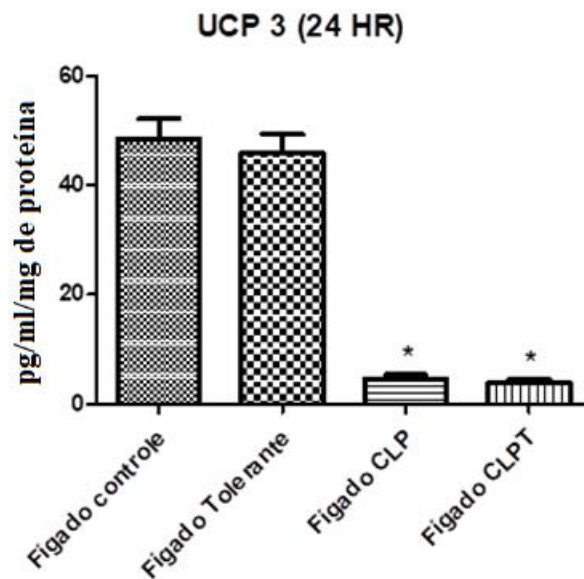
* $p < 0,05$ quando comparado aos grupos Controle e Tolerante

Gráfico 4- Quantificação de UCP-2 em coração de animais submetidos a CLP: papel da tolerância. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. Ao analisarmos a expressão de UCP-2 em coração dos animais, observou-se que houve redução de tal proteína nos animais submetidos a CLP e em animais tolerantes submetidos a CLP quando comparados aos grupos Controle e Tolerante. No entanto, não foi observada diferença estatística nos animais tolerantes não sépticos quando comparados ao grupo Controle. $n=10$ em cada grupo. * $p < 0,05$.

O comportamento da UCP-2 em fígado segue o mesmo comportamento da UCP-2 em coração, conforme comparação dos gráficos 3 e 4. O estímulo pró-inflamatório causado pela CLP reduziu os níveis de UCP-2 no tecido cardíaco, dado o tempo em estudo. Não foi verificado, entretanto, influência da tolerância nessa categoria de proteína desacopladora.

6.2.4 Quantificação da proteína desacopladora 3 (UCP-3) em fígado

Outra etapa do projeto foi a quantificação de UCP-3 no fígado de animais Controle, animais Tolerante, animais CLP, animais CLP Tolerante (CLPT), eutanasiados 24 horas após o procedimento (Gráfico 5). Foi observada redução de UCP-3 no fígado de animais submetidos a CLP e a tolerância não foi efetiva em alterar a resposta dos animais.



* $p < 0,05$ quando comparado aos grupos Controle e Tolerante

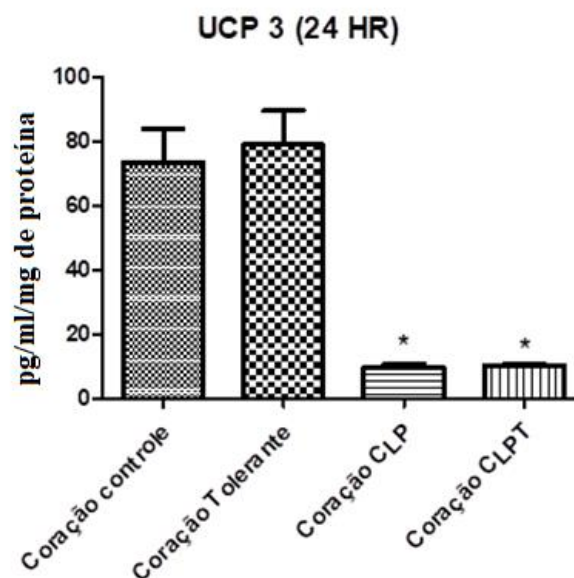
Gráfico 5- Quantificação de UCP-3 em fígado de animais submetidos a CLP: papel da tolerância. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. Os resultados obtidos demonstraram que houve redução de UCP-3 expressa em fígado nos animais submetidos a CLP e em animais tolerantes submetidos a CLP quando comparados aos grupos Controle e Tolerante.

No entanto, não foi observada diferença estatística nos animais tolerantes não sépticos quando comparados ao grupo Controle. n=10 em cada grupo. *p<0,05.

O comportamento da UCP-3 segue o mesmo comportamento da UCP-2. O estímulo pró-inflamatório causado pela CLP reduziu os níveis de UCP-3 no tecido hepático, dado o tempo em estudo. Não foi verificado, entretanto, influência da tolerância nessa categoria de proteína desacopladora.

6.2.5 Quantificação da proteína desacopladora 3 (UCP-3) em coração

Para complementar os dados da seção anterior, foi realizada a quantificação de UCP-3 em coração de animais Controle, animais Tolerante, animais CLP, animais CLP Tolerante (CLPT), eutanasiados 24 horas após o procedimento (Gráfico 6). Foi observada redução de UCP-3 no coração de animais submetidos a CLP e a tolerância não foi efetiva em modificar a resposta dos animais.



*p<0,05 quando comparado aos grupos Controle e Tolerante

Gráfico 6-Quantificação de UCP-3 em coração de animais submetidos a CLP: papel da tolerância. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso

por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. Analisando a expressão de UCP-3 no coração dos animais, observou-se que houve redução de tal proteína nos animais submetidos a CLP e em animais tolerantes submetidos a CLP quando comparados aos grupos Controle e Tolerante. No entanto, não foi observada diferença estatística nos animais tolerantes não sépticos quando comparados ao grupo Controle. $n=10$ em cada grupo. $*p<0,05$.

O comportamento da UCP-3 não sofre alteração quando comparados tecidos diferentes; tanto em fígado quanto em coração, o estímulo pró-inflamatório causado pela CLP reduziu os níveis de UCP-3 no tecido cardíaco, dado o tempo em estudo. Não foi verificado, entretanto, influência da tolerância nessa categoria de proteína desacopladora.

6.3 Quantificação de DNA mitocondrial

Outro dado analisado foi a quantificação de DNA mitocondrial no fígado em animais Controle, animais Tolerante, animais CLP, animais CLP Tolerante (CLPT), eutanasiados 24 horas após o procedimento (Gráfico 7) a partir do método descrito na sessão anterior. A quantificação de DNA mitocondrial é um método utilizado para determinar indiretamente o número de mitocôndrias por célula.

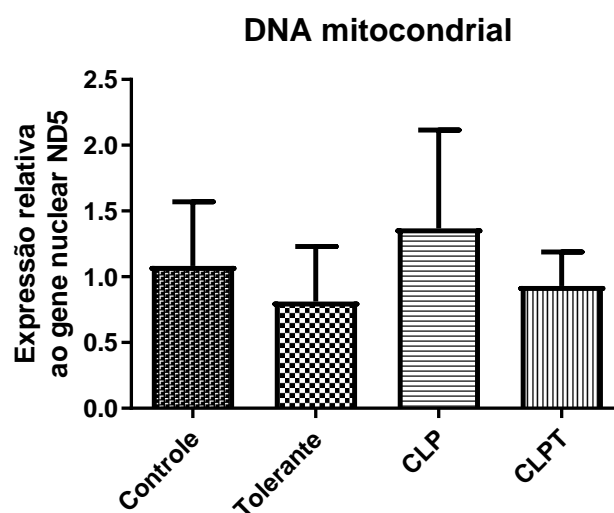


Gráfico 7- Quantificação de DNA mitocondrial de animais submetidos a CLP. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com

administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura e perfuração cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. A quantificação de DNA mitocondrial não apresentou diferença estatística entre os grupos estudados. n=10 em cada grupo. *p<0,05.

A quantificação de DNA mitocondrial revelou que não houve diferença estatística significativa comparando-se todos os grupos em análise. Em vista de não haver diferença na quantificação de DNA mitocondrial, levantou-se a hipótese de que não há diferença na quantidade de mitocôndrias por célula durante a sepse e a tolerância.

6.4 Respiração mitocondrial

Foi feita a avaliação do consumo de oxigênio mitocondrial hepático (Gráfico 8) no Estado 2, Estado 3, Estado 4 e estado desacoplado (FCCP) em mitocôndria hepática isolada de animais Controle, animais Tolerante, animais CLP, animais CLP Tolerante (CLPT), eutanasiados 24 horas após o procedimento.

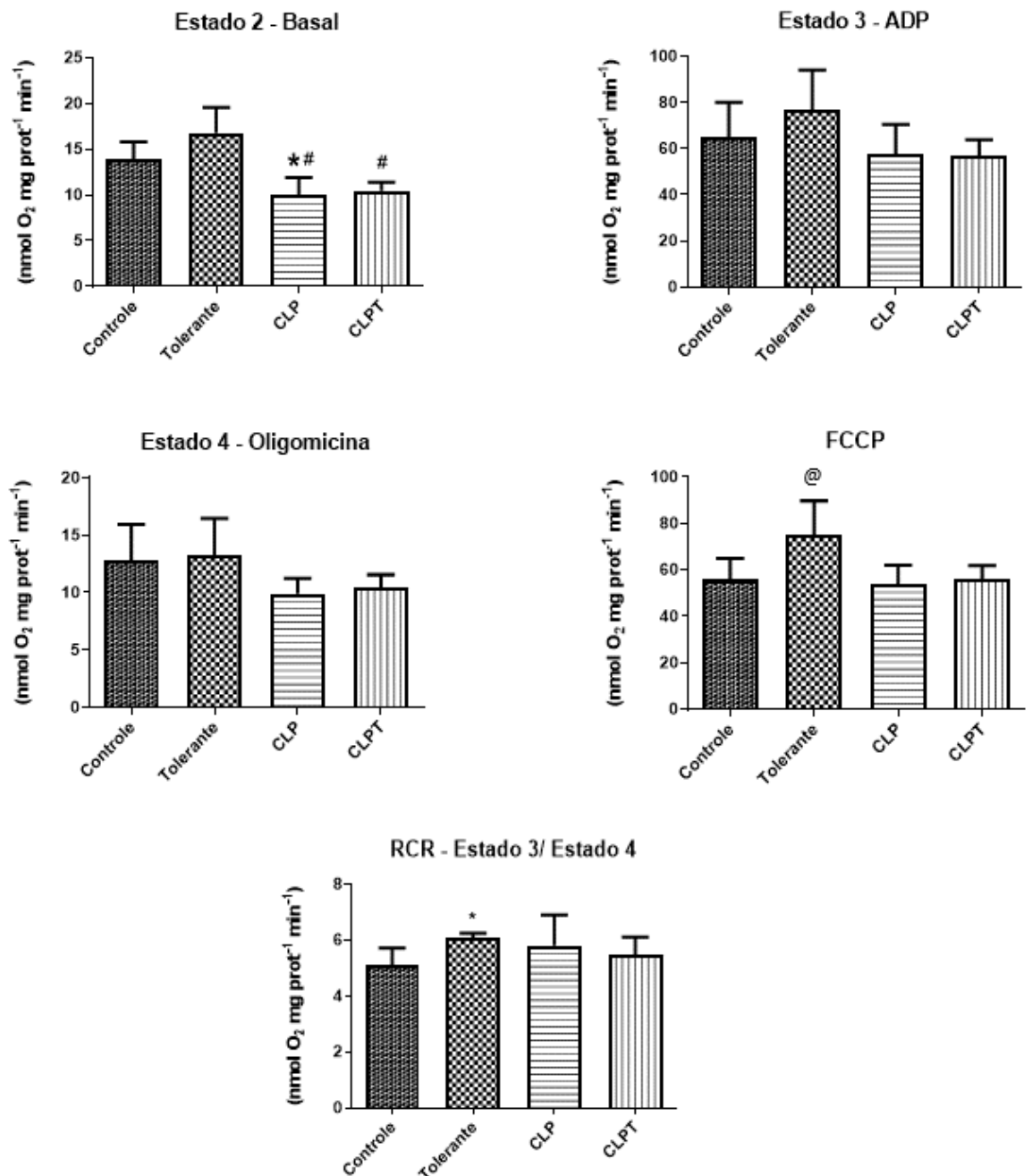


Gráfico 8- Consumo de oxigênio mitocondrial hepático de animais submetidos a CLP. No grupo Tolerante, os camundongos receberam 5 doses de lipopolissacarídeo (LPS), com administrações intraperitoneais diárias de 1mg/kg de LPS durante 5 dias e repouso por 2 dias. No grupo CLP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de ligadura cecal e perfuração (CLP). No grupo CLPT, os animais foram submetidos a ligadura cecal no oitavo dia após tolerância. O material foi coletado após 24 horas. A avaliação da função mitocondrial foi realizada a partir de medidas do consumo de oxigênio mitocondrial nas seguintes condições: basal (Estado 2), estimulação da respiração com ADP (Estado 3), inibição da respiração com

Oligomicina (Estado 4), que age diretamente na ATP-sintase bloqueando o movimento de prótons através desse canal; estimulação da respiração máxima com Fluorocarbonil-Cianeto Fenilhidrazona (FCCP-Estado desacoplado). Por fim, foi inferida a eficiência da respiração mitocondrial através do cálculo do controle respiratório, que compreende a razão do Estado 3 pelo Estado 4. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tolerante, @ $p < 0,05$ quando comparado aos demais grupos. $n = 10$ em cada grupo.

O RCR compreende a razão de controle do consumo de oxigênio, indicando a eficácia da respiração celular, uma vez que se quantifica o oxigênio consumido em ambos os estágios.

Os resultados obtidos revelaram redução do consumo de oxigênio do grupo CLP no estado 2 quando comparado aos grupos Controle e Tolerante, assim como redução do consumo de oxigênio do grupo CLPT no Estado 2 quando comparados ao grupo Tolerante, indicando um déficit do metabolismo oxidativo nos animais sépticos. Além disso, foi possível verificar maior consumo de oxigênio do grupo tolerante em relação aos demais grupos no estado FCCP, o que indica que o tolerante aumentou o transporte de elétrons e, portanto, aumentou a capacidade de gerar ATP. Por fim, RCR apresentou aumento no grupo Tolerante quando comparado ao grupo Controle, demonstrando menor desacoplamento mitocondrial.

7 DISCUSSÃO

A tolerância ao LPS é um mecanismo de proteção contra a síndrome letal da sepse. O pré-condicionamento com LPS atenua a resposta inflamatória do hospedeiro, melhora a depuração bacteriana, aumentando a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais e, assim, aumenta a sobrevivência em um modelo polimicrobiano de sepse induzida por CLP. Estudos prévios mostraram que a indução de tolerância produziu uma redução significativa nos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MIP-2, mas não de IL-10. (West; Heagy, 2002; Wheeler et al., 2008; Melo et al., 2010). Nos nossos ensaios, a realização da curva de sobrevivência revelou que a tolerância aumentou a taxa de sobrevivência de animais sépticos em comparação ao grupo CLP que não foi submetido à tolerância, evidenciando o efeito positivo de tolerância em pacientes submetidos à sepse. O processo inflamatório altera as concentrações de glicose e ácidos graxos assim como a capacidade de respiração mitocondrial.

A teoria quimiosmótica proposta por Peter Mitchell afirma que a oxidação de substratos e a síntese de ATP são indiretamente acopladas por meio do estabelecimento de um gradiente eletroquímico de prótons ou da força próton-motora Δp através da membrana mitocondrial interna. Essa força, que atua sobre prótons, consiste em um componente elétrico (potencial de membrana, $\Delta\Psi_m$) e um componente químico (gradiente de pH) e implica que a membrana interna apresenta baixa condutância intrínseca para prótons. Mitocôndrias hepáticas isoladas na presença de NADH ou FADH₂ exibem um nível de consumo basal de oxigênio mesmo se nenhum ADP for fornecido no meio respiratório. Essa respiração mitocondrial na ausência da síntese de ATP (Estado 2 sem fosforilação) compensa a perda de prótons através da membrana mitocondrial interna. A adição de ADP estimula a síntese de ATP (Estado 3 em fosforilação) por meio do retorno de prótons através de ATP sintase, diminuindo a força próton-motora e estimulando, assim, a respiração. Inibidores como a oligomicina, que bloqueia o canal de prótons da ATP sintase, inibem a respiração relacionada a processos de fosforilação (Estado 4 sem fosforilação). O envolvimento de proteínas desacopladoras (UCPs) são decisivos na dissipação do gradiente de prótons mitocondriais. O aumento da expressão e atividade dessas proteínas poderia explicar o aumento na respiração em Estado 4 sem fosforilação observado durante a sepse. A regulação positiva da síntese de mRNA da UCP-2 é acompanhada por uma redução na geração de ROS nas mitocôndrias hepáticas de ratos com sepse, mas não afeta o vazamento de prótons (Eyenga et al., 2022).

A disfunção do tecido adiposo é caracterizada por redução da adipogênese e aumento da inflamação. A exposição ao lipopolissacarídeo de endotoxina bacteriana leva à disfunção de adipócitos e do tecido adiposo branco, promovendo a inflamação de adipócitos, reduzindo a adipogênese e inibindo a captação de glicose induzida por insulina. A sepse induzida por ligadura e punção cecal em camundongos obesos resulta no aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) no tecido adiposo branco e redução dos níveis de adiponectina circulante. A adiponectina é o principal peptídeo produzido por adipócitos e está envolvida em diversos processos metabólicos, tais como inflamação e angiogênese. Apesar de experimentos *in vitro* terem demonstrado que o meio condicionado com macrófagos atenuou a atividade de adipócitos marrons induzida por frio e que a ativação de receptores que realizam a mediação da via de LPS inibiu a UCP-1 e a respiração mitocondrial em adipócitos marrons, nesse estudo, nenhum efeito da sepse induzida por CLP foi observado na expressão de genes relacionados à atividade termogênica e mitocondrial. Assim, embora a sepse induzida por CLP promova a inflamação de tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom, essa condição inflamatória aguda afeta somente a expressão do gene da adipogênese no tecido adiposo branco, sem efeitos significativos sobre os genes termogênicos no tecido adiposo marrom, sugerindo uma dissociação da inflamação aguda da disfunção do tecido adiposo no tecido adiposo marrom, porém não no tecido adiposo branco (Moreno-Navarrete JM et al., 2021).

A sepse induz disfunção de múltiplos órgãos, incluindo o coração, os pulmões e os rins. O tecido adiposo permanece um tecido negligenciado como um órgão de armazenamento de lipídios, porém sabe-se que é um órgão metabolicamente dinâmico, capaz de sintetizar compostos biologicamente ativos que regulam a homeostase metabólica. Evidências sugerem que o tecido adiposo passa por um processo conhecido como “escurecimento”, no qual o tecido adiposo branco (WAT) pode adotar um fenótipo de tecido adiposo marrom (BAT) em resposta a estímulos. Uma das características do escurecimento é a expressão da UCP-1. O processo de escurecimento foi descrito em situações com estímulos adrenérgicos aumentados, como a exposição ao frio, queimaduras e sepse. A lipólise é uma das principais funções do tecido adiposo e durante esse processo são liberados ácidos graxos livres para utilização de energia. Na sepse, camundongos obesos têm uma resposta inflamatória do tecido adiposo diminuída, incluindo níveis mais baixos de IL-6 no plasma no início da sepse. A obesidade é acompanhada por uma diminuição nos subtipos de receptores β -adrenérgicos, o que poderia explicar a falta de escurecimento encontrada no tecido adiposo obeso após a sepse. No estudo de Ayalon et al. (2018), foi demonstrado que a densidade mitocondrial e a expressão de UCP-1 aumentam

durante a sepse (18 horas após CLP) em camundongos não obesos, mas não em camundongos obesos (Ayalon et al., 2018).

Um modelo de sepse realizado pela ligadura e punção cecal em camundongos revelou estresse do retículo endoplasmático e aumento de 2 vezes na UCP-1, pelo menos até 10 dias de acompanhamento. O aumento induzido por hipoxia na produção de lactato pode estimular o escurecimento do tecido adiposo através da expressão de UCP-1 e outros genes associados à função termogênica (Alipoor et al., 2020). Nos nossos resultados obtidos, a indução de tolerância não alterou níveis significativos de UCP-1 comparado com controle. Por outro lado, após 24 horas de sepse, os níveis de UCP-1 estavam significativamente aumentados nos grupos CLP e CLP tolerante, quando comparados aos grupos Controle, sendo consistentes com os dados apresentados em literatura.

Uma das possibilidades que vão de encontro com os resultados obtidos é de que a proteína desacopladora 1 é conhecida por sua função na termogênese adaptativa e no controle do peso corporal, em que um estímulo frio ou a superalimentação resulta no estímulo simpatomimético de receptores β 3-adrenérgicos no tecido adiposo marrom. Isso causa a regulação positiva da expressão de mRNA de UCP-1, ativação de UCP-1 por ácidos graxos produzidos a partir de lipólise e a transdução da força próton-motora mitocondrial em calor (Azzu et al., 2010).

O modelo de sepse polimicrobiana, via ligadura e punção cecal, causa aumento nas taxas de respiração no estado IV em mitocôndrias isoladas de fígado e músculo de ratos. A hipótese levantada pelos autores sugere que o desacoplamento mitocondrial parece ser um mecanismo que explica a redução da eficiência mecânica cardíaca no choque séptico (Cortez-Pinto et al., 1998). Em outro estudo da literatura, as quantidades de mRNA e de proteína UCP-2 foram dosados. A CLP causou aumento no mRNA de UCP-2 cardíaco 12 horas após a início da sepse, em comparação com o controle. Estudos anteriores mostraram que a UCP-2 é induzida no fígado, tecido adiposo branco e músculo esquelético por modelos experimentais de sepse. O aumento da expressão do mRNA da UCP-2 pode ter sido desencadeado pela hipotermia observada 12 horas após o CLP. Embora CLP resulte no aumento da expressão de mRNA de UCP-2 no tecido cardíaco após 12 horas, não há proteína UCP-2 detectável em mitocôndria do coração controle, laparotomia simulada ou animais sépticos. Portanto, a proteína UCP-2 não regula a função mitocondrial do coração normal e que o mRNA não reflete as quantidades reais de proteína. O trabalho demonstrou que CLP causa aumento nos níveis de mRNA da UCP-2, concomitante à diminuição do trabalho cardíaco e da eficiência mecânica, porém nenhuma

UCP-2 foi detectada 12 horas após CLP. Na ausência da UCP-2 no coração durante o tempo em que há uma diminuição significativa na eficiência mecânica, conclui-se que a UCP-2 não é a responsável por esta alteração (Roshon et al., 2003). Nossos resultados contrastam com a literatura, pois mostraram uma redução da UCP-2 nos animais sépticos em comparação aos grupos Controle e Tolerante. Na sepse, ocorre déficit de produção de ATP e alteração do potencial de membrana mitocondrial, o que pode causar uma retroalimentação negativa sobre a UCP-2. Esta menor quantidade de UCP-2 pode ser um mecanismo de defesa para tentar manter a quantidade de ATP e as funções das células.

A regulação da UCP-2 ocorre pela modulação da atividade de proteína e do teor de proteína. Os ligantes, como ácidos graxos e derivados de ROS, estimulam a atividade da UCP-2 em mitocôndrias isoladas. Nos estados de hiperglicemia e hiperlipidemia, a transcrição do gene UCP-2 é ativada por proteínas reguladoras, como receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), fatores de transcrição *forkhead* e proteína 1c de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP-1c). A Sirt1, uma proteína envolvida na resistência ao estresse metabólico, suprime a função dessas proteínas, reduzindo, assim, a expressão de UCP-2 e promovendo a secreção de insulina. Além disso, espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na regulação positiva da expressão de UCP-2, resultando na defesa celular através de uma alça de *feedback* negativo que diminui a produção de ROS (Azzu et al., 2010).

As sirtuínas (SIRT) são uma família de proteínas sensíveis a NAD⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e estão dispersas ao longo de compartimentos celulares: nuclear (SIRT1, SIRT6 e SIRT7), citoplasmático (SIRT2) e mitocondrial (SIRT3, SIRT4 e SIRT5). As sirtuínas regulam diversos processos celulares associados à sinalização do estresse oxidativo. SIRT1, SIRT3 e SIRT5 protegem as células de dano por ROS/RNS, enquanto SIRT2, SIRT6 e SIRT7 modulam genes do estresse oxidativo. As sirtuínas são reguladores epigenéticos por meio da desacetilação de Histonas e/ou de interações com outras proteínas que controlam a acetilação de Histona ou enzimas de metilação de DNA (Gandhirajan; Roychowdhury; Vachharajani, 2021).

Pacientes com sepse apresentam hiperinflamação durante o estágio inicial, que é caracterizada por uma tempestade de citocinas, produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e alterações metabólicas. Nesse estágio, a ativação da SIRT1 apresentou efeitos benéficos por meio de três vias: desacetilação de citocinas inflamatórias, como NF- κ B e HMGB1, levando a uma resposta inflamatória atenuada; desacetilação de fatores relacionados ao estresse oxidativo, como FOXO1 α e SOD2, melhorando, a capacidade antioxidante;

desacetilação de um fator pró-apoptótico p53, causando redução da apoptose celular (Li et al., 2018).

A sepse está associada à redução da capacidade respiratória mitocondrial. Uma proporção variável de prótons é desacoplada a partir da síntese de ATP pelo vazamento para a matriz mitocondrial, com a taxa de fluxo de prótons dependente da magnitude do potencial de membrana. A taxa de vazamento de prótons é variável, e considera-se que constitui cerca de 20% da taxa metabólica basal de hepatócitos e até 50% no músculo esquelético de ratos. A respiração desacoplada possui componentes basais e induzíveis, e a parte induzível forma o mecanismo de geração de calor no tecido adiposo marrom por meio da proteína desacopladora UCP-1. O aumento da expressão de UCP-2 e UCP-3, relatado em modelos de camundongos com sepse, sugere um possível aumento no vazamento de prótons com redução na eficiência do acoplamento mitocondrial. Foram relatadas diferenças na resposta metabólica à sepse entre ratos e camundongos. Conforme observado no estudo, os camundongos apresentam um fenótipo hipometabólico e depressão miocárdica precoce. Essa apresentação é observada em cerca de 10% dos casos de sepse humana, e está associada a um risco de mortalidade elevado em duas a três vezes. O $\Delta\Psi_m$ baixo foi um achado nos camundongos com sepse e sugere uma taxa reduzida de geração de $\Delta\Psi_m$ (por exemplo, devido a um defeito na cadeia respiratória) ou um aumento na renovação de vias que dissipam o gradiente, como vazamento de prótons ou produção de ATP (Zolfaghari et al., 2015).

O aumento da produção da proteína UCP-3, relatado em modelos de camundongos sépticos, sugere um possível aumento no vazamento de prótons com redução na eficiência de acoplamento mitocondrial. O estudo também utilizou animais *knock out* de UCP-3 e verificou que a ausência de UCP-3 do músculo esquelético não teve impacto nas alterações metabólicas, temperatura, função cardiovascular e muscular ou mortalidade na sepse. A cinética de vazamento de prótons não foi afetada pelo insulto séptico, apesar do aumento nos níveis de proteína UCP-3 em camundongos sépticos (Sun et al., 2003; Thompson; Kim, 2004; Zolfaghari et al., 2015). No estudo de Zolfaghari et al. (2015), a expressão da UCP-3 foi avaliada em 24 horas apenas em músculo esquelético e a metodologia utilizada foi indução de sepse pela injeção intraperitoneal de pasta cecal diluída (20 ml/kg), porém tal método não constitui o padrão ouro para indução de sepse. Nos nossos ensaios, foi observado redução dos níveis de UCP-3 nos grupos CLP e CLPT quando comparado aos grupos Controle e Tolerante. A literatura mostra redução do ATP e aumento da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, comprometendo a eficiência energética celular. A redução da UCP-3 nos nossos

estudos pode ser uma decorrência de um mecanismo de retroalimentação negativa para preservar o potencial de produção de ATP.

O papel das mitocôndrias na morte celular está ligado à apoptose, onde a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) gera uma cascata de sinalização que leva à morte celular. A MOMP é iniciada pela formação de macroporos na membrana mitocondrial externa (OMM), permitindo a liberação de proteínas solúveis do espaço intermembrana mitocondrial (IMS). Dentre as proteínas IMS, o citocromo c, um componente essencial da cadeia de transporte de elétrons, quando liberado no citosol, contribui para a formação de apoptosomos, que iniciam a cascata de caspases. Os canais de íons, incluindo canais de potássio, cálcio, sódio e cloreto, podem ser considerados como reguladores cruciais da morte celular por apoptose. Nas mitocôndrias, os canais de íons estão envolvidos na regulação de diversos processos mitocondriais, como a regulação do potencial da membrana e da liberação de ROS. Mesmo quando as vias de sinalização responsáveis pela iniciação da MOMP não são totalmente ativadas, o citocromo c e outras proteínas IMS podem ser liberadas no citosol através da ruptura da OMM devido ao processo denominado “transição de permeabilidade” (PT), que é definida como um aumento repentino na permeabilidade da IMM para íons e outros solutos de até 1,5 kDa, levando à despolarização mitocondrial, interrupção da síntese de ATP e, eventualmente, à morte celular. A PT é um processo regulado e reversível, que necessita de acúmulo de Ca^{2+} na matriz e é causado pela abertura de um canal denominado PTP. A abertura de PTP é um evento regulado, sendo facilitado pela ligação de ciclofilina D (CyPD), ácidos graxos livres, acúmulo de cálcio na matriz, de espécies reativas de oxigênio (ROS), subprodutos da OXPHOS, ou por baixo potencial transmembrana. A sobrecarga de cálcio na matriz mitocondrial leva à abertura persistente de PTP e, eventualmente, à morte celular. Outros canais de íons no IMM foram ligados à sobrevivência celular, incluindo os canais de potássio ativados por cálcio, o canal K^+ dependente de ATP e as proteínas desacopladoras (Urbani et al., 2020).

A produção de ROS mitocondrial é sensível a alterações na força próton-motriz (PMF) na membrana mitocondrial interna (MIM). Uma alteração discreta na PMF intensifica a produção de ROS. PMF elevada é causada pelo aumento da extrusão de prótons mitocondriais ou pela redução do retorno de prótons (ou ambos) e aumenta a produção de ROS mitocondriais. O retorno de prótons à matriz mitocondrial por meio de ATP sintase (respiração acoplada) ou mecanismos de vazamento de prótons (respiração desacoplada) é capaz de reduzir a PMF e, assim, reduzir de forma aguda a emissão de ROS. Desacopladores químicos, como FCCP ou

2,4-dinitrofenol, diminuem a produção de ROS mitocondriais ao reduzir a PMF na membrana mitocondrial interna (MIM). Estima-se que o vazamento de prótons (por UCPs, ANTs ou outros mecanismos) represente uma proporção significativa (20-50%) da respiração celular em repouso, o que pode representar um desperdício. No entanto, o vazamento de prótons é maior quando as demandas de ATP celular estão em seu nível mais baixo, por exemplo, um músculo em repouso. Portanto, vazamentos de prótons são análogos a uma “válvula de pressão” no sentido de que eles diminuem a PMF para limitar a produção de ROS. A abertura transitória do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) também foi associada à regulação da emissão de ROS mitocondriais. No entanto, ainda permanece incerto se a abertura transitória de MPTP está ou não associada ao metabolismo normal ou à disfunção mitocondrial (a abertura de MPTP está geralmente associada à apoptose). A UCP-1 é ativada por ácidos graxos quando há um aumento na estimulação simpática desse tecido. O vazamento de prótons por meio da UCP-2 e UCP-3 está associado à redução da emissão de ROS a partir das mitocôndrias (Mailloux; Harper, 2012).

Os resultados dos estudos de Silva (2017) revelaram que a quantificação de DNA mitocondrial foi maior no grupo CLP em relação ao grupo controle (os demais grupos permaneceram iguais). A quantificação do mtDNA foi realizada pelo mesmo método que os nossos estudos, porém com tempo diferente (4 horas). Apesar da alta quantidade de mitocôndrias no tecido e baixa razão de respiração celular, essas mitocôndrias não estão funcionais em relação à produção de ATP, podendo ser consideradas mitocôndrias imaturas, formadas a partir da expressão alta de fatores da biogênese mitocondrial. Nossos resultados não revelaram diferença estatística do número de mitocôndrias entre os grupos estudados provavelmente devido ao fato que nossas dosagens foram realizadas em tempo muito diferente do autor.

Estudos demonstraram alterações na função mitocondrial durante a sepse. Rosser et al. (1998) demonstraram aumento do consumo de oxigênio por hepatócitos expostos a endotoxina em 6 horas, contudo, após 24 horas, o consumo retornou para níveis basais. Em nosso estudo, a avaliação da função mitocondrial foi realizada através da verificação do consumo de oxigênio mitocondrial em respirometria de alta resolução em oxígrafo Oroboros. Nossos resultados mostraram uma redução da respiração mitocondrial, sem alteração na quantidade de mitocôndrias, contrastando com os dados *in vitro* e com LPS da literatura. A redução do consumo de oxigênio em 24 horas, encontrada em nosso estudo, pode ser explicada pelo

processo de hipóxia citopática em que a célula não consome oxigênio por bloqueio da atividade dos citocromos da cadeia respiratória.

O fato da taxa de consumo de oxigênio retornar ao normal após 24 horas de exposição à endotoxina pode indicar problemas metabólicos como um defeito na função da cadeia respiratória (diretamente ou como consequência da disfunção do ciclo de ácido cítrico) ou por hipoxia celular (Rosser et al., 1998). A fim de investigar isso, a capacidade das células de aumentar seu consumo de oxigênio foi medida, através do uso de FCCP, permitindo a comparação do consumo de oxigênio máximo com o consumo de oxigênio basal no mesmo grupo de células. FCCP faz com que o gradiente de íons de hidrogênio na membrana mitocondrial interna seja dissipado (ao permitir que íons de hidrogênio passem através do complexo ATP sintase sem criar ATP a partir de ADP), desacoplando efetivamente a cadeia respiratória da produção de ATP, maximizando o consumo de oxigênio. Utilizando o método de consumo máximo de oxigênio *in vitro*, verificou-se que as células expostas ao LPS não conseguiram atingir o consumo máximo de oxigênio. Este dado em conjunto com o fato que a câmara com as células continha oxigênio em quantidade adequada permite concluir que a sepse produz uma alteração no metabolismo do ácido cítrico. Nosso estudo foi realizado com animais em sepse por CLP, diferindo do estudo acima que utilizou células submetidas a LPS; além disso, utilizamos um equipamento ultrasensível. Desta forma, nossos resultados mostraram uma redução de consumo de oxigênio basal, porém o consumo máximo não estava alterado. A etapa do nosso estudo que utilizou oligomicina evidencia que o consumo de oxigênio por desacoplamento está reduzido. Desta forma, podemos concluir que o consumo basal é menor na CLP do que controle devido a menor desacoplamento, sem alterar a capacidade máxima de consumo de oxigênio, o que é realçado pela etapa do estudo onde ADP é adicionado ao meio, na qual o consumo de oxigênio é igual em todos os grupos.

O estudo de Callahan et al. (2001) revelou ausência de alteração nas taxas de consumo de oxigênio mitocondrial no Estado 3 em 24 horas após endotoxina. Porém, houve uma redução nas taxas de consumo de oxigênio 48 horas após a administração de endotoxina em mitocôndrias do diafragma. Os dados desse estudo fornecem evidências de que essa alteração na função mitocondrial está relacionada à formação de radicais livres, uma vez que a administração de um inibidor da síntese de óxido nítrico e de um eliminador de superóxido evitou a disfunção mitocondrial no Estado 3 em animais tratados com endotoxina. A explicação mais provável é de que o peroxinitrito, o produto da reação de óxido nítrico e superóxido, é responsável pela disfunção mitocondrial em Estado 3 após a administração de endotoxina.

Estudos anteriores indicam que a incubação *in vitro* de peroxinitrito com frações mitocondriais reduz as taxas do Estado 3 da respiração sem causar o desacoplamento da fosforilação oxidativa. Diversas proteínas mitocondriais que estão envolvidas na fosforilação (ou seja, subunidade a de ATPase sintase, NADH-NADPH transhidrogenase, subunidade 4 de NADH desidrogenase, subunidade I do citocromo c, núcleo proteico 1 de ubiquinol citocromo c redutase) apresentam pesos moleculares na faixa das proteínas constatadas como esgotadas em 48 horas no estudo. Não foi constatado nenhuma evidência de desacoplamento da fosforilação oxidativa após a administração de endotoxina. Pode-se presumir que o desacoplamento da fosforilação oxidativa ocorre em um momento inicial após a administração de endotoxina, enquanto reduções no Estado 3 da respiração e depleção de proteínas mitocondriais ocorrem somente após uma exposição mais prolongada à endotoxina.

Segundo Kantrow et al. (1997), as alterações no metabolismo oxidativo hepático são complexas no modelo de sepse com CLP em ratos. Foi constatada uma redução no consumo total de oxigênio endógeno por células intactas isoladas de ratos com sepse, enquanto a fração não mitocondrial de consumo de oxigênio celular não foi diferente dos controles. Pode-se dizer que a respiração celular é reduzida em hepatócitos, com disfunção do Complexo respiratório II, succinato desidrogenase, em células isoladas durante a sepse.

Eyenga et al. (2022), utilizando ligadura e punção cecal (CLP), demonstrou um aumento no consumo de oxigênio de mitocôndrias hepáticas isoladas. Esses resultados foram surpreendentes, considerando que o consumo de oxigênio de hepatócitos foi constatado como reduzido durante a sepse segundo Kantrow et al. (1997). Um aumento de rebote no consumo de oxigênio e na produção de ATP na fase de recuperação da sepse refletiria a recuperação mitocondrial. Em estudos com modelo de peritonite em roedores, foi avaliado o curso de tempo da fosforilação oxidativa em mitocôndrias hepáticas durante a sepse, o que permitiu a medição da geração de ATP e do consumo de oxigênio enquanto manteve concentrações baixas constantes de ADP no meio respiratório para criar condições de fosforilação próximas àquelas de células intactas nas quais o estado de fosforilação oxidativa está entre os Estados 4 e 3. A análise quantitativa que mede a taxa de síntese de ATP associada ao consumo de oxigênio (O_2) permite que a eficiência geral das reações (ATP:O) seja determinada. A razão de ATP:O pode ser interpretada mesmo na presença de desacoplamento intrínseco, a partir da inclinação da relação linear entre fosforilação e a taxa respiratória. Foi demonstrado que a sepse causa desacoplamento entre a geração de ATP e o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias. Essa redução na eficiência de energia (desacoplamento da fosforilação oxidativa) reflete uma

alteração dos processos envolvidos na regulação da fosforilação oxidativa mitocondrial. Três principais mecanismos podem estar envolvidos: no nível da condutância da membrana (vazamento de prótons e/ou cátions); no sítio de acoplamento entre os fluxos de elétrons e prótons ao longo da cadeia respiratória; ou no nível de acoplamento entre os fluxos de prótons e da síntese de ATP através de ATP sintase mitocondrial. Há outros mecanismos para a regulação da síntese de ATP mitocondrial, como a depleção do substrato para fosforilação oxidativa ou a dissipação do potencial da membrana mitocondrial por meio do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP). Foi demonstrado que o desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial ocorreu em 36 horas após CLP em ratos e confirmado que uma inibição consistente e precoce do Complexo IV ocorre durante a sepse (Eyenga et al., 2022).

Os resultados do experimento de Silva (2017) mostraram que a tolerância desempenha papel na proteção da mitocôndria. No tempo estudado (4 horas), o RCR do grupo CLP se manteve significativamente diferente dos demais grupos, enquanto o grupo CLP Tolerante se manteve igual aos grupos Controle e Tolerante, indicando que o grupo CLP Tolerante manteve os níveis de respiração mitocondrial iguais ao grupo Controle, mostrando proteção pela tolerância. Animais tolerantes apresentam inibição da produção de fator de necrose tumoral estimulada por lipopolissacarídeo, inibição da ativação de MAP-quinase, alteração dos níveis de interleucina-1 e interleucina-6, ativação aumentada de ciclooxygenase-2 e translocação de NF- κ B prejudicada. Nossos resultados divergiram do estudo de Silva (2017) pois o grupo CLP não apresentou redução do RCR, não sendo possível verificar uma efetiva proteção da tolerância durante a sepse. Nosso estudo foi realizado em camundongos e em 24 horas após a CLP, enquanto Silva realizou o estudo em ratos e em 4 horas após CLP. Esses dados, juntamente com o fato de serem equipamentos diferentes, podem justificar as diferenças nos resultados.

A disfunção mitocondrial gera danos a células e órgãos, podendo ser um mecanismo causador da disfunção de múltiplos órgãos. As alterações respiratórias e metabólicas das mitocôndrias estão interligadas com as alterações de potencial de membrana mitocondrial e indução de apoptose via mitocôndria. Estas alterações têm sido descritas em diversas células e Singer (2014) relatou alterações em células do sistema imunológico. Foi demonstrado redução da atividade respiratória mitocondrial de células do sistema imune nos estágios iniciais de pacientes sépticos admitidos na UTI. Os resultados são divergentes, refletindo diferenças na população estudada, sítio experimental e quais marcadores de mitocôndrias foram escolhidos

para a avaliação da respiração. A sepse induz uma resposta de biogênese em que o número, a massa e/ou a função mitocondrial aumentam após a fase inicial da sepse (Singer, 2014). Potenciais intervenções que revertam ou previnam as alterações da função mitocondrial são relevantes na sepse.

8 CONCLUSÃO

Nossos estudos revelaram que a tolerância ao lipopolissacarídeo não modificou as quantidades de UCP-1, UCP-2 e UCP-3, ou seja, não apresentou influência sobre o desacoplamento mitocondrial. O aumento da UCP-1 observado após estímulo séptico é essencial para melhor regulação térmica para combater o processo infeccioso. A redução das proteínas desacopladoras UCP-2 e UCP-3 podem ser explicadas como mecanismo compensatório ao déficit de produção de ATP observado durante a sepse. Nossos ensaios revelaram que a tolerância não foi capaz de proteger contra o desacoplamento mitocondrial da sepse.

A quantificação de mitocôndrias por célula, através do DNA mitocondrial, não revelou diferenças significativas entre os grupos e a avaliação da respiração mitocondrial revelou redução do estado basal de consumo de oxigênio em animais submetidos à sepse.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-93.

Abraham E. New Definitions for Sepsis and Septic Shock: Continuing Evolution but With Much Still to Be Done. *JAMA*. 2016;315(8):757-9.

Akhmedov AT, Rybin V, Marín-García J. Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2015;20(2):227-49.

Alberts B. *Molecular biology of the cell*. Sixth edition. ed. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015. 1 volume.

Alhadi HA, Fox KA. Heart-Type Fatty Acid-Binding Protein in the Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction: The potential for influencing patient management. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2010;10(1):41-9.

Alipoor E, Hosseinzadeh-Attar MJ, Rezaei M, Jazayeri S, Chapman M. White adipose tissue browning in critical illness: A review of the evidence, mechanisms and future perspectives. *Obes Rev*. 2020;21(12):e13085.

Arulkumaran N, Deutschman CS, Pinsky MR, Zuckerbraun B, Schumacker PT, Gomez H, et al. Mitochondrial function in Sepsis. *Shock*. 2016;45(3):271-81.

Assunção M, Akamine N, Cardoso GS, Mello PV, Teles JM, Nunes AL, et al. Survey on physicians' knowledge of sepsis: do they recognize it promptly? *J Crit Care*. 2010;25(4):545-52.

Atay E, Guzel M, Amanvermez R, Demir MT, Erenler AK, Ozgen E, et al. Role of Gal-3 and H-FABP in the early diagnosis of acute coronary syndrome. *Bratisl Lek Listy*. 2019;120(2):124-30.

Ayalon I, Shen H, Williamson L, Stringer K, Zingarelli B, Kaplan JM. Sepsis Induces Adipose Tissue Browning in Nonobese Mice But Not in Obese Mice. *Shock*. 2018;50(5):557-64.

Azevedo LC. Mitochondrial dysfunction during sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2010;10(3):214-23.

Azzu V, Brand MD. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(5):298-307.

Azzu V, Jastroch M, Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):785-91.

Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, Dobb G, Levy M, Martin G, et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. *Infection.* 2009;37(3):222-32.

Boss O, Muzzin P, Giacobino JP. The uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinol.* 1998;139(1):1-9.

Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, et al. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* 1997;408(1):39-42.

Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2005;2(2):85-93.

Busiello RA, Savarese S, Lombardi A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol.* 2015;6:36.

Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2018;1859(9):940-50.

Callahan LA, Stofan DA, Szweda LI, Nethery DE, Supinski GS. Free radicals alter maximal diaphragmatic mitochondrial oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(1):129-38.

Camara Y, Mampel T, Armengol J, Villarroya F, Dejean L. UCP3 expression in liver modulates gene expression and oxidative metabolism in response to fatty acids, and sensitizes mitochondria to permeability transition. *Cell Physiol Biochem.* 2009;24(3-4):243-52.

Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care.* 2006;10(5):233.

Chen FC, Xu YC, Zhang ZC. Multi-biomarker strategy for prediction of myocardial dysfunction and mortality in sepsis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2020;21(7):537-48.

Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet.* 2006;47(1):39-48.

Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metab.* 2019;29(1):27-37.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917):885-91.

Cortez-Pinto H, Yang SQ, Lin HZ, Costa S, Hwang CS, Lane MD, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251(1):313-9.

Dare AJ, Phillips AR, Hickey AJ, Mittal A, Loveday B, Thompson N, et al. A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(11):1517-25.

Das UN. Heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) and coronary heart disease. *Indian Heart J.* 2016;68(1):16-8.

De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(1):98-104.

Demine S, Renard P, Arnould T. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells.* 2019;8(8).

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature.* 2002;415(6867):96-9.

Emre Y, Hurtaud C, Nübel T, Criscuolo F, Ricquier D, Cassard-Doulier AM. Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *Biochem J.* 2007;402(2):271-8.

Erlanson-Albertsson C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand.* 2003;178(4):405-12.

Essop MF, Razeghi P, McLeod C, Young ME, Taegtmeier H, Sack MN. Hypoxia-induced decrease of UCP3 gene expression in rat heart parallels metabolic gene switching but fails to affect mitochondrial respiratory coupling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314(2):561-4.

Eyenga P, Rey B, Eyenga L, Sheu SS. Regulation of Oxidative Phosphorylation of Liver Mitochondria in Sepsis. *Cells*. 2022;11(10).

Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*. 2012;151(2):400-13.

Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(8):760-5.

Flohé SB, Agrawal H, Schmitz D, Gertz M, Flohé S, Schade FU. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol*. 2006;79(3):473-81.

Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*. 2007;447(7147):972-8.

Gandhirajan A, Roychowdhury S, Vachharajani V. Sirtuins and Sepsis: Cross Talk between Redox and Epigenetic Pathways. *Antioxidants (Basel)*. 2021;11(1)

Ganeshan K, Nikkanen J, Man K, Leong YA, Sogawa Y, Maschek JA, et al. Energetic Trade-Offs and Hypometabolic States Promote Disease Tolerance. *Cell*. 2019;177(2):399-413.e12.

Garlid KD, Jabůrek M, Jezek P, Varecha M. How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim Biophys Acta*. 2000;1459(2-3):383-9.

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.

Gnaiger E. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. Vol. 327, *Mitochondrial dysfunction in drug-induced toxicity*. 2008. p. 327–52.

Henneke P, Golenbock DT. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med*. 2002;30(5 Suppl):S207-13.

Hoffmann U, Espeter F, Weiß C, Ahmad-Nejad P, Lang S, Brueckmann M, et al. Ischemic biomarker heart-type fatty acid binding protein (hFABP) in acute heart failure - diagnostic and prognostic insights compared to NT-proBNP and troponin I. *BMC Cardiovasc Disord*. 2015;15:50.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 1999;162(7):3749-52.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348(2):138-50.

Huang W, Wang X, Zhang H, Wang C, Liu D. The Value of Serum Uncoupling Protein-2 Level for the Patients With Sepsis. *Shock.* 2020;54(3):301-7.

Hubacek JA, Stüber F, Fröhlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M, et al. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med.* 2001;29(3):557-61.

Jang DH, Greenwood JC, Spyres MB, Eckmann DM. Measurement of Mitochondrial Respiration and Motility in Acute Care: Sepsis, Trauma, and Poisoning. *J Intensive Care Med.* 2017;32(1):86-94.

Jezeq P, Garlid KD. Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30(11):1163-8.

Ježek P, Holendová B, Garlid KD, Jabůrek M. Mitochondrial Uncoupling Proteins: Subtle Regulators of Cellular Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2018;29(7):667-714.

Jiang D, Shen M, Yuan X, Wang M, Li S, Jiang W, et al. Serum heart-type fatty acid-binding protein as a predictor for the development of sepsis-associated acute kidney injury. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019;19(8):757-65.

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.

Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014;5:461.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(4):333-43.

Le Minh K, Kuhla A, Abshagen K, Minor T, Stegemann J, Ibrahim S, et al. Uncoupling protein-2 deficiency provides protection in a murine model of endotoxemic acute liver failure. *Crit Care Med.* 2009;37(1):215-22.

Ledesma A, de Lacoba MG, Rial E. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol.* 2002;3(12):REVIEWS3015.

Li L, Chen Z, Fu W, Cai S, Zeng Z. Emerging Evidence concerning the Role of Sirtuins in Sepsis. *Crit Care Res Pract.* 2018;2018:5489571.

Lodish HF. *Molecular cell biology.* Eighth edition. ed. New York: W.H. Freeman-Macmillan Learning; 2016. xl, 1170 pages.

Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Angotti Carrara FS, Sousa JL, et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(11):1180-9.

Mailloux RJ, Harper ME. Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(9):451-8.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394-7.

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(2):135-45.

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.

Moon JS, Lee S, Park MA, Siempos II, Haslip M, Lee PJ, et al. UCP2-induced fatty acid synthase promotes NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *J Clin Invest.* 2015;125(2):665-80.

Moreno-Navarrete JM, Comas F, de Jager V, Fernández-Real JM, Bouma HR. Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis Promotes Brown Adipose Tissue Inflammation Without Any Impact on Expression of Thermogenic-Related Genes. *Front Physiol.* 2021;12:692618.

Murray AJ, Anderson RE, Watson GC, Radda GK, Clarke K. Uncoupling proteins in human heart. *Lancet*. 2004;364(9447):1786-8.

Nicholls DG. The physiological regulation of uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(5-6):459-66.

Palmieri F. Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett*. 1994;346(1):48-54.

Pan P, Wang X, Liu D. The potential mechanism of mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. *J Int Med Res*. 2018;46(6):2157-69.

Park DW, Zmijewski JW. Mitochondrial Dysfunction and Immune Cell Metabolism in Sepsis. *Infect Chemother*. 2017;49(1):10-21.

Pecqueur C, Bui T, Gelly C, Hauchard J, Barbot C, Bouillaud F, et al. Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *FASEB J*. 2008;22(1):9-18.

Peng W, Huang J, Zheng Y, Ding Y, Li S, Zhang J, et al. UCP2 silencing aggravates mitochondrial dysfunction in astrocytes under septic conditions. *Mol Med Rep*. 2019;20(5):4459-66.

Peppler WT, Anderson ZG, MacRae LM, MacPherson REK, Wright DC. Habitual physical activity protects against lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse adipose tissue. *Adipocyte*. 2017;6(1):1-11.

Peters A, Saito H, Borzykowski T, Kilpatrick C, Allegranzi B, Pittet D. Let's prevent sepsis in health care - The 5 May 2018 World Health Organization (WHO) SAVE LIVES: Clean Your Hands campaign. *J Infect*. 2018;76(6):563-9.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.

Ricquier D, Kader JC. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976;73(3):577-83.

Roshon MJ, Kline JA, Thornton LR, Watts JA. Cardiac UCP2 expression and myocardial oxidative metabolism during acute septic shock in the rat. *Shock*. 2003;19(6):570-6.

Rosser DM, Manji M, Cooksley H, Bellingan G. Endotoxin reduces maximal oxygen consumption in hepatocytes independent of any hypoxic insult. *Intensive Care Med.* 1998;24(7):725-9.

Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulier AM, Bouillaud F, et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 1:S130-5.

Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med.* 2006;355(16):1699-713.

Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biol (Praha).* 2005;51(5):148-57.

Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):775-87.

Silva, André Augusto Botêga. Alterações funcionais de mitocôndrias hepáticas na tolerância ao lipopolissacarídeo (LPS) [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2017; doi:10.11606/D.5.2018.tde-03012018-110429.

Silva E, Pedro MeA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2004;8(4):R251-60.

Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence.* 2014;5(1):66-72.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-10.

Siqueira-Batista R, Gomes AP, Calixto-Lima L, Vitorino RR, Perez MC, Mendonça EG, et al. Sepsis: an update. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011;23(2):207-16.

Soriano FG, Liaudet L, Szabó E, Virág L, Mabley JG, Pacher P, et al. Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock.* 2002;17(4):286-92.

Sreedhar A, Zhao Y. Uncoupling protein 2 and metabolic diseases. *Mitochondrion.* 2017;34:135-40.

Stuart JA, Brindle KM, Harper JA, Brand MD. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *J Bioenerg Biomembr.* 1999;31(5):517-25.

Sun X, Wray C, Tian X, Hasselgren PO, Lu J. Expression of uncoupling protein 3 is upregulated in skeletal muscle during sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(3):E512-20.

Talbot DA, Lambert AJ, Brand MD. Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett.* 2004;556(1-3):111-5.

Thompson MP, Kim D. Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs. *FEBS Lett.* 2004;568(1-3):4-9.

Toda C, Diano S. Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28(5):757-64.

Urbani A, Prosdocimi E, Carrer A, Checchetto V, Szabò I. Mitochondrial Ion Channels of the Inner Membrane and Their Regulation in Cell Death Signaling. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:620081.

Van der Slikke EC, Star BS, van Meurs M, Henning RH, Moser J, Bouma HR. Sepsis is associated with mitochondrial DNA damage and a reduced mitochondrial mass in the kidney of patients with sepsis-AKI. *Crit Care.* 2021;25(1):36.

Viriyakosol S, Kirkland T, Soldau K, Tobias P. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res.* 2000;6(6):489-91.

Weiss SL, Peters MJ, Alhazzani W, Agus MSD, Flori HR, Inwald DP, et al. Surviving sepsis campaign international guidelines for the management of septic shock and sepsis-associated organ dysfunction in children. *Intensive Care Med.* 2020;46(Suppl 1):10-67.

West AP, Shadel GS. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(6):363-75.

West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med.* 2002;30(1 Supp):S64-S73.

Wheeler DS, Lahni PM, Denenberg AG, Poynter SE, Wong HR, Cook JA, et al. Induction of endotoxin tolerance enhances bacterial clearance and survival in murine polymicrobial sepsis. *Shock*. 2008;30(3):267-73.

Wiersinga WJ, Seymour CW, European Sepsis Academy, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESGIBS (ESMID Study Group for Bloodstream Infections and Sepsis). *Handbook of sepsis*. Cham, Switzerland: Springer; 2018. viii, 267 pages p.

Yan GT, Lin J, Hao XH, Xue H, Zhang K, Wang LH. Heart-type fatty acid-binding protein is a useful marker for organ dysfunction and leptin alleviates sepsis-induced organ injuries by restraining its tissue levels. *Eur J Pharmacol*. 2009;616(1-3):244-50.

Yoshimoto K., Tanaka T., Somiya K., Tsuji R., Okamoto F., Kawamura K., et al. Proteína citoplasmática de ligação a ácidos graxos do tipo coração humano como um indicador de infarto agudo do miocárdio. *Vasos Cardíacos*. 1995; 10 (6): 304-9.

Yu XX, Barger JL, Boyer BB, Brand MD, Pan G, Adams SH. Impact of endotoxin on UCP homolog mRNA abundance, thermoregulation, and mitochondrial proton leak kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(2):E433-46.

Zhong X, He J, Zhang X, Li C, Tian X, Xia W, et al. UCP2 alleviates tubular epithelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by decreasing ROS production. *Biomed Pharmacother*. 2019;115:108914.

Zolfaghari PS, Carré JE, Parker N, Curtin NA, Duchon MR, Singer M. Skeletal muscle dysfunction is associated with derangements in mitochondrial bioenergetics (but not UCP3) in a rodent model of sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;308(9):E713-25.