

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
BRUNO BÚRIGO PERUCHI**

**DISFUNÇÃO CONTRÁTIL DIAFRAGMÁTICA E DANO MITOCONDRIAL EM RATOS COM
SEPSE**

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2009

BRUNO BÚRIGO PERUCHI

**DISFUNÇÃO CONTRÁTIL DIAFRAGMÁTICA E DANO MITOCONDRIAL EM RATOS COM
SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P471d Peruchi, Bruno Búrigo.
Disfunção contrátil diafragmática e dano mitocondrial em ratos com sepse / Bruno Búrigo Peruchi; orientador: Felipe Dal Pizzol.-- Criciúma, SC: Do autor, 2009.
60: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2009.

1. Diafragma. 2. Sepse. 3. Patologia mitocondrial. I.Título.

CDD 616.2. -- 22ed.

Bibliotecária: Flávia Caroline Cardoso – CRB 14/840
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
 Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
 Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
 Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentado pelo candidato **BRUNO BÚRIGO PERUCHI** sob o título “Disfunção contrátil diafragmática e dano mitocondrial em ratos com sepse” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 26 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. João Luciano de Quevedo
Membro Relator

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos
Membro Externo

Profa Dra Tatiana Barichello
Membro Interno

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Orientador

Prof. Dr. João Luciano de Quevedo
Coordenador do PPGCS

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, meu pai Mário, minha mãe Célia e minha irmã Mariana, pelo incentivo e apoio dado sempre.

Ao Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol que abriu as portas do laboratório para que eu pudesse iniciar o mestrado e também pela amizade, confiança e seus ensinamentos.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Unesc, deixo aqui meu agradecimento ao Prof. Dr. Emílio Streck e ao Prof. Dr. João Quevedo.

Larissa Constantino, doutoranda, que considero uma doutora pela sua capacidade, inteligência e experiência na área. Sempre esteve disposta a me ajudar, tirando “algumas” horas suas e me ensinando muito sobre sepse.

Aos colegas do mestrado, principalmente ao Paulo Silveira, Adalberto Castro, Eduardo Ghisi, David Pereira, Omar Cassol, Clarissa Martinelli, Orlando Tobias Júnior, Fabrícia Petronilho, Gislaine Rezin, pelos momentos de descontração e estudo.

Aos bolsistas do PPGCS, principalmente ao Luis, Mariana, Cínara e a Fran.

Ao médico Sandro Santa Rosa, intensivista da UTI e a toda equipe da UTI do Hospital São João Batista.

Aos colegas de trabalho Mariana Peruchi, Renata Pazini, Rafaela Bialeck, que cobriram meus plantões quando estive ausente.

E a todos aqueles que me incentivaram!

Obrigado a todos.

RESUMO

Em uma Unidade de Terapia Intensiva temos, comumente, a presença de pacientes com sepse, esta por ser uma resposta inflamatória sistêmica a uma infecção, requer suporte avançado de vida. Sepse é uma enfermidade com tratamento de alto custo para os cofres públicos e aos planos de saúde, levando uma boa parte dos pacientes à morte. Mesmo com todo o investimento em pesquisa nos grandes centros, a *causa mortis* é a disfunção de múltiplos órgãos (DMO), caracterizada pela deterioração aguda da função de dois ou mais órgãos. Além disso, a perda de massa muscular é uma consequência da sepse, sendo que estudos indicam possíveis causas para essa disfunção contrátil. Adicionalmente, o diafragma, principal músculo da respiração e responsável pela ventilação dos pulmões, pode ficar comprometido na condição que o paciente séptico se encontra, muitas vezes submetido à ventilação mecânica, drogas vasoativas, antibióticos, sedativos e também a restrição no leito, fazendo com que essa perda muscular seja agravada. Alguns estudos indicam que essa diminuição muscular pode também estar relacionada com a disfunção mitocondrial existente na sepse. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a força do diafragma em ratos induzidos à sepse relacionando com disfunção mitocondrial. Foram utilizados ratos wistar machos (com 60 dias), sendo divididos em dois grupos experimentais com n: 07, grupo Sham (controle) e grupo CPL (ligação cecal e perfuração). Nós avaliamos a disfunção muscular na sepse através da mensuração da força dos músculos inspiratórios com o auxílio de um manovacuômetro digital do diafragma e a dosagem no tecido diafragmático e no quadríceps, dos complexos da cadeia respiratória e a formação do ânion superóxido e peroxidação de lipídeos em partículas submitocondriais. Verificamos a redução da força dos músculos inspiratórios em ratos CLP quando comparados com o grupo Sham e esta parece estar correlacionada com a produção de superóxido e disfunção da cadeia de transporte de elétrons. Em 12 horas após CLP ocorreu uma significativa diminuição na atividade do complexo II-III. Porém, num tempo mais prolongado, 48h após CLP, houve uma diminuição na atividade de todos os complexos. Diferentemente do diafragma, a cadeia de transportes de elétrons no quadríceps aumentou em todos os complexos, 48 h após CLP, e nos complexos II-III e IV um pequeno aumento na atividade. Não houve um aumento significativo no dano oxidativo submitocondrial no quadríceps, em contrapartida, observamos logo no início da sepse um aumento na produção de superóxido, seguido de um aumento tardio de níveis de TBARS no diafragma. Em conclusão, disfunção de força diafragmática é precoce após CLP e existem diferenças marcantes na função mitocondrial entre dois diferentes músculos esqueléticos.

Palavras-chave: Diafragma, sepse, disfunção mitocondrial

ABSTRACT

The presence of septic patients in an Intensive Care Unit (ICU) is a common feature. Sepsis is a disease with high-cost treatment, leading to a high rate of morbidity and mortality. Despite advances in sepsis understanding, the multiple organ dysfunction syndrome (MODS), is still the ultimate cause of death in these patients. In this context, loss of muscle mass is a consequence of sepsis, and studies that indicate possible causes for this contractile dysfunction are still controversial. Additionally, the diaphragm, the main muscle responsible for breathing and ventilation of the lungs, can be jeopardized under several conditions imposed to septic patients in the ICU as mechanical ventilation, vasoactive drugs, antibiotics, sedatives and bed restriction, so that muscle loss could be multifactorial. Some studies indicate that decreased muscle strength may also be related to mitochondrial dysfunction exists in sepsis. Therefore, the objective of this study was to evaluate the strength of the diaphragm in septic rats and correlate this to mitochondrial dysfunction. We used male Wistar rats divided into two experimental groups, Sham-operated (control) group and sepsis induced by cecal ligation and perforation (CLP). We evaluated the muscle dysfunction in sepsis by measuring the strength of the inspiratory muscles using a digital manovacuometer. In addition, we evaluate mitochondrial respiratory chain activity, mitochondrial formation of superoxide anion and mitochondrial lipid peroxidation in diaphragm, correlating these parameters to strength and comparing to mitochondrial alterations in the quadriceps. We demonstrated a diminution in the strength of inspiratory muscles in CLP rats compared with the Sham group and this was related to superoxide production and respiratory chain alterations. In 12 hours after CLP there was a significant decrease in activity of complex II-III, and at 48 hours after CLP, there was a decrease in activity of all complexes. Different from diaphragm, the electron transport chain in the quadriceps increased in all complexes 48 h after CLP. There was no significant increase in oxidative damage and superoxide production in the quadriceps. But that was a significant decrease in the strength of the diaphragm in rats with sepsis. In conclusion, diaphragm dysfunction is an early event on sepsis induced by CLP, and mitochondrial dysfunction is somewhat different when compared to skeletal muscles.

Key-words: Diaphragm, Sepsis, mitochondrial dysfunction

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - difosfato de adenosina

ATP - trifosfato de adenosina

BPM - batimentos por minuto

CAT - catalase

CLP - ligação e perfuração cecal

DMO - disfunção de múltiplos órgãos

ERN - espécies reativas de nitrogênio

ERO - espécies reativas de oxigênio

FADH₂ - flavina adenina dinucleotídeo

F_{max} - força máxima

GMPc - guanosina monofosfato cíclico

GPx - glutathione peroxidase

IL - interleucina

iNOS - óxido nítrico sintase induzida

IRpA - insuficiência respiratória pulmonar aguda

LPS - lipopolissacarídeo

mm₃ - milímetros cúbicos

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO - óxido nítrico

O₂ - oxigênio

PaCO₂ - pressão parcial de gás carbônico

PaO₂ - pressão parcial de oxigênio

PiMax - pressão inspiratória máxima

SARA - síndrome da angústia respiratória do adulto

SDH - succinato desidrogenase

SIRS - síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SOD - superóxido dismutase

TNF- α - fator de necrose tumoral

UTI - unidade de terapia intensiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura interna da mitocôndria.....	16
Figura 2. Complexos da cadeia respiratória mitocondrial.....	18
Figura 3. Relação da inflamação com aumento de radicais livres e dano muscular.....	23

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Sepses.....	11
1.2 Disfunção de múltiplos órgãos.....	14
1.3 Sepses e mitocôndria.....	15
1.4 Sepses e espécies reativas de oxigênio (EROS).....	19
1.5 Sepses, diafragma e óxido nítrico (NO)	21
1.6 Sepses e fator de necrose tumoral (TNF-α).....	25
1.7 Sepses, músculo esquelético e o diafragma.....	26
2 – OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3. ARTIGO	
<i>Skeletal muscle electron transport chain dysfunction after sepsis induced by cecal ligation and perforation in rats</i>	32
4 - DISCUSSÃO	52
5- CONCLUSÃO.....	55
6 - REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE

A sepse é conhecida por ser uma resposta inflamatória sistêmica frente um microrganismo invasor (Bozza, 2005). Habitualmente, pacientes com quadros infecciosos apresentam reação inflamatória localizada apenas no sítio da infecção (por exemplo, no pulmão, nos casos de pneumonia). Por fatores ainda não bem esclarecidos, algumas pessoas desenvolvem uma reação inflamatória sistêmica fazendo com que haja lesão à distância, ou seja, em outros órgãos (Silva, 2006).

Segundo *Silva e colaboradores* (2003) a causa mais comum de morte em pacientes com sepse é a disfunção de múltiplos órgãos (DMO), caracterizada pela deterioração aguda da função de dois ou mais órgãos. Os órgãos habitualmente envolvidos são pulmões, rins, coração (incluindo o sistema vascular) e fígado.

A forma mais grave da sepse é o choque séptico, em que o indivíduo apresenta grave hipotensão arterial, necessitando de medicamentos endovenosos para sustentar uma pressão arterial próxima do normal (Silva, 2006).

O choque séptico é a décima causa mais freqüente de morte nos Estados Unidos e, no Brasil são 400 mil casos novos de sepse por ano, sendo que 20% dos leitos são ocupados por pacientes com sepse grave e a taxa de mortalidade é de aproximadamente 60%, enquanto que a média mundial não ultrapassa 40% (Silva, 2006). Para *Crouser* (2004) a sepse nos EUA, pode ser considerada a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva, com mortalidade de cerca de 30%.

Um estudo recente realizado nos Estados Unidos revelou que sepse grave é responsável por mais de 215.000 mortes anuais a partir de uma população total de 750.000 pacientes com taxa média de mortalidade de aproximadamente 29% (Matos, 2003). E essa incidência tem aumentado nas últimas décadas, com cerca de 40% dos pacientes com confirmação hemoculturas positivas (Silva, 2006), devido a crescente população de idosos, o emprego de técnicas invasivas, a maior sobrevivência de diversas doenças debilitantes e imunossupressivas e as infecções hospitalares (Knobel, 1998).

Diante deste quadro clínico e da associação de fatores é possível observar que a sepse mantém o paciente internado por longos períodos, gerando um custo médio de aproximadamente U\$ 50.000 (Bozza, 2005), levando a um custo total de mais de 17 bilhões de dólares ao ano (Silva, 2006).

Como a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva não-coronarianas, sendo a mortalidade 5% maior nos homens pode ocorrer em qualquer pessoa e por infecção de qualquer tipo, mas freqüentemente está associada à pneumonia, trauma, cirurgia, grandes queimaduras e neoplasias malignas (David, 2007).

Podemos dizer que tem sepse, todo o paciente que apresente sinais e sintomas da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) secundários a um processo infeccioso. A presença de dois ou mais dos seguintes critérios definem SIRS: a) temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; b) freqüência cardíaca > 90 bpm; c) freqüência respiratória > 20 movimentos/minuto (alternativamente $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg ou pacientes sob ventilação mecânica); d) número de leucócitos no sangue periférico $> 12.000/\text{mm}^3$ ou $< 4.000/\text{mm}^3$ ou, ainda, presença de $> 10\%$ de formas jovens (bastões) (Silva, 2006 e David, 2007).

Dentro do quadro inflamatório do desenvolvimento de SIRS e sepse as citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis importantes, interferindo no prognóstico, evolução e intensidade do dano tecidual (Salles, 1999).

Atualmente o papel de diversos mediadores na patogênese da sepse tem sido esclarecido (Reinhart e Karzai, 2001). Brevemente, os microorganismos causadores liberam ou secretam na corrente sangüínea alguns componentes estruturais, como, por exemplo, lipossacarídeo, capazes de estimular a liberação de mediadores derivados de células do sistema imune ou de proteínas plasmáticas pré-formadas. Estes mediadores podem induzir alterações profundas na fisiologia normal da vascularização e órgãos-alvo. Apesar de alguns mediadores serem mais importantes que outros provavelmente mediadores dos microorganismos e do hospedeiro interagem sendo, provavelmente, sua ação conjunta responsável pela patogênese da sepse.

Dentre os mediadores envolvidos na gênese da sepse podemos destacar (Das, 2000):

- Citoquinas: principalmente derivadas do sistema monócito / macrófago, sendo as mais importantes: as interleucinas (IL) principalmente IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF). Selectinas: expressão de receptores de adesão (selectinas) nas células endoteliais aumenta a migração de neutrófilos e a reação inflamatória associada;
- Óxido nítrico (NO): modulação da expressão de óxido nítrico sintetase leva a um aumento na produção de NO, que pode estar associado parcialmente à hipotensão associada a sepse (Szabo, 1998);
- Metabólitos do ácido aracdônico: envolvidos em vasodilatação, agregação plaquetária e ativação neutrofílica durante a sepse.

- Espécies ativas de oxigênio (EAO): recentemente tem-se identificado as EAO como mediadores de diversas fases de dano celular e ativação de células imunes durante a sepse (Zhang, *et al.*, 2000);
- Proteínas do grupo de alta mobilidade I (HMG-I) (antigamente conhecida como anfoterina): recentemente identificou-se esta proteína estrutural da cromatina como um dos possíveis mediadores envolvidos na mortalidade induzida pela sepse (Wang *et al.*, 1999).

A interação dos diversos mediadores leva a depressão miocárdica, alteração da função vascular e dano em órgãos-alvo, e em alguns casos a morte por hipotensão refratária ou falência de múltiplos órgãos.

1.2 DISFUNÇÃO DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS

Como a sepse se caracteriza por ser uma patologia sistêmica essa disfunção pode ser encontrada em diversos órgãos vitais, conforme demonstrado em diversos estudos em fígado (Crouser *et al.*, 2004), coração (Joshi *et al.*, 2006), músculo esquelético (Protti *et al.*, 2007) e íleo (Crouser *et al.*, 1999).

Na sepse e disfunção de múltiplos órgãos, pacientes que utilizam bloqueadores neuromusculares por períodos prolongados podem apresentar quadriplegia, com sinais clínicos e eletromiográficos de degeneração axonal primária, denervação e atrofia muscular, esta última é devida a fatores como a interleucina-1, o aumento das prostaglandina E₂, das catecolaminas e do cortisol, que levam à excessiva destruição de proteínas musculares (Knobel, 1998).

1.3 SEPSE E MITOCÔNDRIA

Defeitos mitocondriais ocorrem em uma ampla variedade de doenças degenerativas, envelhecimento e câncer. Um dos primeiros indícios de que a mitocôndria pôde desempenhar um papel na patogênese foi há 40 anos em um paciente com hipermetabolismo, cujo músculo esquelético continha grande número de mitocôndrias anormais, uma condição agora conhecida como miopatia mitocondrial (Wallace, 1999).

A disfunção mitocondrial, em humanos, foi relatada primeiramente por *Cowley e colaboradores* (1979) em órgãos vitais durante a sepse, após a morte, foi verificada degeneração da membrana mitocondrial em coração, rim, fígado, pâncreas e pulmão e diminuição da atividade em fígado e rim.

Trabalhos recentes sugerem que a disfunção mitocondrial pode estar diretamente associada à produção de anormalidades bioquímicas, características da sepse (Callahan, 2005).

Investigações atuais indicam que a mitocôndria é o primeiro alvo que sofre dano em órgãos sistêmicos durante a fase aguda de sepse, embora seu estado funcional, em organismos vivos, tenha sido tópico de controversas nas últimas três décadas (Crouser, 2004).

A mitocôndria (Figura 1) é a organela responsável pela respiração celular, por meio da oxidação dos produtos do metabolismo, sendo responsável por 95% da produção de energia em forma de ATP na maioria das células, abertura de vias de morte celular (apoptose e necrose), regulação intracelular de cálcio, sensoriamento do oxigênio, esteroidogênese, sinalização. A geração de energia mitocondrial é um sistema complexo que depende da

demanda metabólica, que é aumentada durante períodos de atividades de alta intensidade e estresse (Singer, 2007).

A matriz mitocondrial contém as enzimas envolvidas no ciclo de Krebs, porém a succinato desidrogenase fica ligada à membrana interna que se localiza na matriz. Também se encontra na membrana interna da mitocôndria os complexos enzimáticos envolvidos no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa (Devlin e Michelacci, 2003).

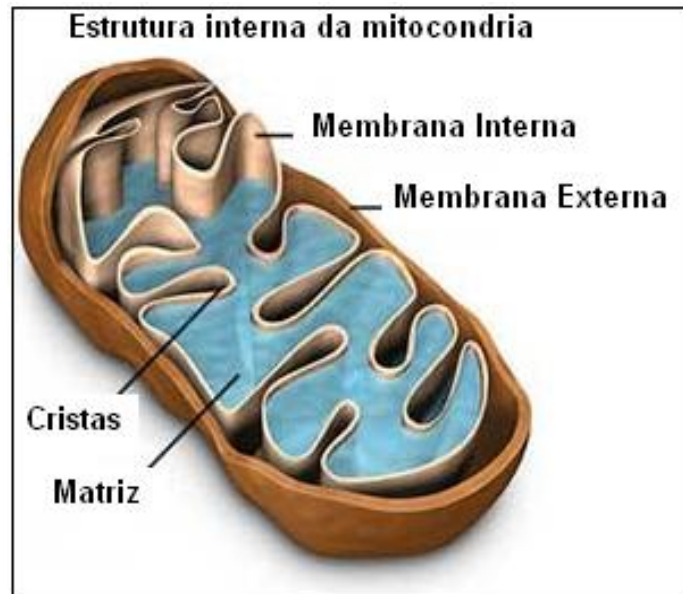


Figura 1 – Estrutura interna da mitocôndria

Em um estudo recente, mostrou-se redução severa da função mitocondrial em músculos esqueléticos em muitos pacientes criticamente doentes com sepse, sendo um preditor para o aumento da mortalidade (Callahan, 2005).

Durante a produção de ATP, estão envolvidos os complexos da cadeia respiratória (Figura 2) (I, II, III e IV) e da ATP sintase.

O complexo I também chamado de NADH: ubiquinona oxirredutase, realiza a transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona, formando ubiquinol. Essa reação faz com que dois prótons sejam bombeados para o espaço intermembrana. O complexo II também denominado de succinato: ubiquinona oxirredutase, é formado pela enzima succinato desidrogenase (SDH) e três subunidades hidrofóbicas. Esse complexo participa do ciclo de Krebs e transfere elétrons do succinato para a ubiquinona e também forma ubiquinol.

O complexo III, ou citocromo c oxirredutase, transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo c, reação que serve para o bombeamento de mais quatro prótons.

O complexo IV mais conhecido como citocromo c oxidase transfere elétrons do citocromo c para o oxigênio e forma água. Nessa etapa os últimos dois prótons são bombeados (Berg et al., 2004; Voet e Voet, 1995; Wallace, 1999).

O gradiente eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons durante a cadeia respiratória mitocondrial é utilizado como força motriz para a ATP sintase, formar ATP (fosforilação oxidativa). O ATP é transportado para fora da mitocôndria com o concomitante transporte de ADP para dentro da mitocôndria, através de um sistema antiporte (Berg et al., 2004; Heales et al., 1999; Wallace, 1999; Nelson e Cox, 2000; Voet e Voet, 1995).

A enzima succinato desidrogenase é responsável pela oxidação do succinato a fumarato no Ciclo do Ácido Cítrico, ou seja, é a única deste ciclo ligada à membrana interna da mitocôndria. Através dela, os elétrons são doados ao FAD, para serem entregues a ubiquinona (UBQ) via ferro-enxofre no complexo II, ou seja, os elétrons que chegam via FADH₂ serão responsáveis pelo bombeamento de prótons a partir do complexo III, portanto responsável pela síntese de 1 ATP a menos pelo FADH₂ em comparação ao NADH⁺ pelo complexo I. A atividade diminuída da succinato desidrogenase acarretará em baixa doação

de elétrons ao FAD e posteriormente ao complexo II (Crouser, 2004; Navarro e Boveris, 2007).

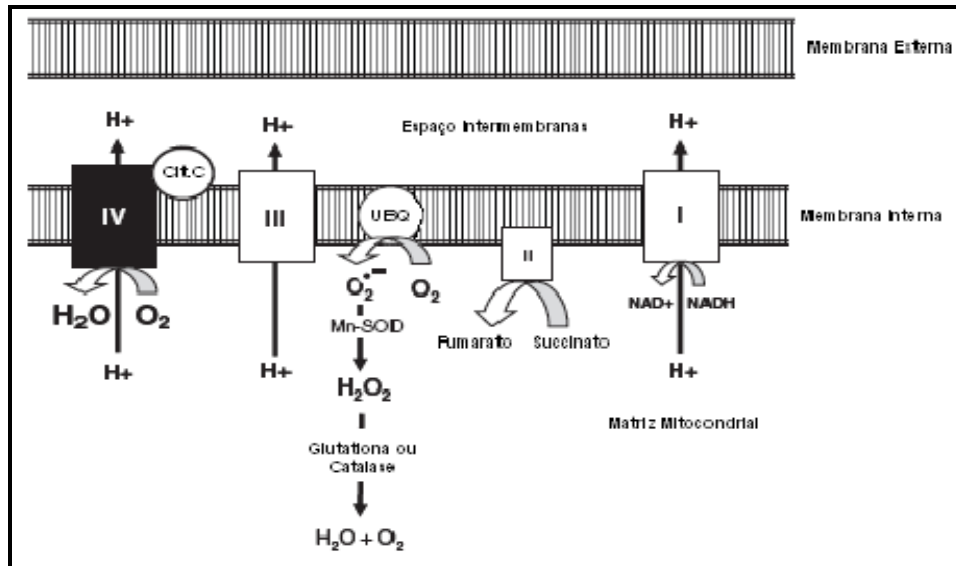


Figura 2 – Complexos da cadeia respiratória mitocondrial. (Adaptado de D'Ávila, 2008).

Quando a atividade de algum complexo mitocondrial é diminuída ou inibida, a produção de ATP proveniente da fosforilação oxidativa mitocondrial é comprometida, podendo ocorrer por uma série de vias disparadas pela liberação de alguns mediadores inflamatórios como o TNF- α , que são capazes de induzir uma disfunção mitocondrial e hipóxia tecidual em órgãos vitais (Wu et al., 2002).

Neste contexto, a creatina quinase desempenha um papel importante no metabolismo energético, catalisando a transferência reversível do grupo fosforil ao grupo fosfocreatina e ADP para regenerar em ATP, ou seja, produzindo ATP para complementar a baixa produção e garantir aos tecidos energia suficiente para que não ocorra dano celular (Lipskaya, 2001),

por isso, o nível de ATP representa o equilíbrio entre a geração e utilização de energia (Kilpatrick et al., 1981).

1.4 SEPSE E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

O metabolismo de oxigênio está comprometido na sepse. A reperfusão ou a re-oxigenação causam aumento da produção de radicais livres e está associada ao dano tecidual (Salles et al, 1999).

Em circunstâncias normais na mitocôndria o oxigênio está diretamente ligado à formação de ATP e os restantes formam espécies reativas de oxigênio (EROS). Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Por isso, são muito reativos e atacam moléculas, como lipídeos, proteínas e DNA. Dentre os radicais livres, podem-se destacar dois grupos: as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN).

As ERO mais importantes são o ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, ânion hipoclorito e o oxigênio “singlet”. O óxido nítrico e o peroxinitrito constituem as principais ERN (Halliwell e Gutteridge, 1999). A Formação de EROS na sepse é em grande parte resultando do desvio dos elétrons do complexo I quando este encontrasse alterado (Navarro e Boveres, 2007).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, é decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gerando um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões

oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular. Este tipo de lesão oxidativa é definido como estresse oxidativo, que designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (Rover Júnior, 2001).

Algumas destas defesas antioxidantes são enzimáticas, como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), mas existem também as defesas não-enzimáticas, como as vitaminas A, C, E, e a glutathione (Ames et al., 1993).

Para *Ritter e colaboradores* (2003) acredita-se que as EROS são importantes mediadores de lesão celular, contribuindo para o desenvolvimento da sepse, sendo que as propriedades pró-inflamatórias das EROS incluem dano celular endotelial, formação de fatores quimiotáticos, recrutamento de neutrófilos, peroxidação lipídica, oxidação, dano no DNA, liberação de TNF- α e de interleucina e formação de peroxinitrito.

Radicais livres derivados de oxigênio pode ser uma fonte potencial de lesão direta às fibras do diafragma. Ânions superóxido e peróxido de hidrogênio podem ser produzidos sob várias condições, e a taxa de produção pelo próprio músculo pode aumentar com a contração diafragmática (David, 2004). Estresse oxidativo está ligado fortemente ao desenvolvimento de disfunção do diafragma durante a sepse (Ebihara, 2002).

O radical superóxido é formado após a primeira redução do oxigênio. Ele ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos (Halliwell e Gutteridge, 2006).

Estudos mostraram que alterações no consumo de oxigênio tecidual durante o desenvolvimento da sepse, estão correlacionadas com evidências histológicas de dano mitocondrial, mas não tem relação com níveis de distribuição de oxigênio (Callahan, 2005).

Uma das mais importantes fontes de EROs é a redução tetravalente do oxigênio como consequência da endotoxemia, hipóxia e acidose. Danos celulares musculares e acidose aumentam a quantidade de ferro livre liberto da mioglobina e hemoglobina e pela perigosa reação Fenton (Ritter, 2004).

Devido aos radicais livres causarem dano somente quando sua produção é aumentada e/ou as defesas antioxidantes são diminuídas, nós sugerimos que a superprodução de derivados do oxigênio possa desempenhar um papel na redução da contratilidade diafragmática em animais CLP (Fujimura, 2000).

Ritter e colaboradores (2004) usaram N-acetilcisteína em ratos sépticos induzidos por CLP e observaram uma significativa melhora na sobrevivência desses animais, devido à redução do estresse oxidativo e por limitação da infiltração de neutrófilos e da disfunção mitocondria.

1.5 SEPSE, DIAFRAGMA E ÓXIDO NÍTRICO (ON)

Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (ON), que ocorre como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células e atualmente é identificado como o fator relaxante dependente do endotélio e um importante vasodilatador (Rover Júnior, 2001).

O argumento de que os radicais livres desempenham um papel importante como mediadores da disfunção muscular esquelética na sepse é baseado numa série de estudos

que analisam os efeitos dos inibidores de ONS sobre a função muscular em modelos animais de sepse (Callahan, 2001).

Inibidores da ONS e seus metabólitos em modelo animal demonstraram prevenir o prejuízo da contratilidade nos músculos pela produção de ON e seus metabólitos (Lin, 1998; Gath, 1996).

Alguns estudos sugerem que uma variedade de radicais livres estão envolvidos na disfunção muscular durante a sepse e identificou-se várias vias bioquímicas pelas quais os radicais livres são gerados no músculo esquelético durante o processo inflamatório (Callahan, 2001).

Muitos pesquisadores relatam que a expressão de iONS é induzida nos músculos ventilatórios e dos membros em resposta da injeção de LPS em várias espécies. *Comtois* (2001) mostrou que a atividade de ONS nos músculos ventilatórios tem aumentado significativamente em ratos sépticos e que tanto iONS e isoformas de ONS contribuem para a taxa de síntese de ON.

Em trabalho anterior desenvolvido por *Ebihara* (2002) foi observada uma aparente relação entre lesão sarcolemal e expressão de iONS em músculos de ratos sépticos, e a inibição farmacológica da atividade de ONS foi capaz de impedir o desenvolvimento de boa parte da lesão sarcolemal do diafragma. Com base nessas observações, concluíram que a superprodução de ON desempenha um papel central na patogênese da lesão do diafragma durante a sepse.

Atualmente tem-se relatado que apesar de muito substancial o efeito protetor do ON em relação à contratilidade e lesão sarcolemal, sua atuação no uso de ventilação mecânica não reduz a expressão de iONS no diafragma de ratos com sepse (Ebihara, 2002).

Uma possibilidade a considerar é que a ventilação mecânica pode exercer um efeito protetor alterando o fluxo sanguíneo, uma vez que aumenta o fluxo várias vezes durante o choque séptico em animais com respiração espontânea (Ebihara, 2002).

Quando há alteração nas funções das mitocôndrias, ocorre a interrupção da respiração aeróbica, acúmulo de ácido láctico e corpos cetônicos, interferindo na síntese de ATP e aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Chen et al., 2004; Venditti, Rosard, Meo, 2004; Kim et al., 2004), gerando aumento nos níveis de óxido nítrico (NO), produzido durante a sepse (Heinen, 2006).

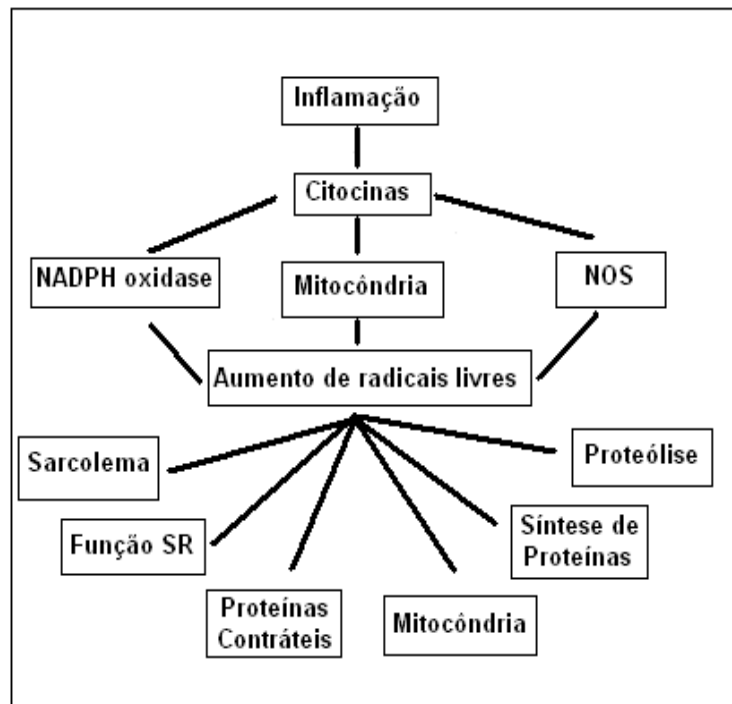


Figura 3 – Relação da inflamação com aumento de radicais livres e dano muscular (Adaptado de Supinski e Callahan, 2006).

Contois e colaboradores (2001) demonstraram que a sepse induzida pela injeção de LPS ou ligação e perfuração cecal (CLP) em ratos causou dano sarcolemal mais grave nos músculos ventilatórios que nos músculos dos membros que coincidiu com o aumento nos níveis de iONS nesses músculos. A constatação de que o grau de lesão sarcolemal em animais com sepse foi significativamente reduzido quando inibidores de ONS foram infundidos, levou a conclusão de que ON desempenha um papel na manutenção da integridade sarcolemal.

A descoberta do óxido nítrico (ON) como mediador de hipotensão (David, 2004), LPS e TNF-induzida, foi considerada uma grande avanço, que levaria a rápida solução para o problema da hipotensão na sepse. No entanto, o ON é considerado uma molécula com propriedades tanto protetoras como deletérias. A NOS atua como mensageiro molecular e parece ser ativador endógeno do GMPc, que é responsável por vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e modulação da adesão dos leucócitos no endotélio (Salles et al., 1999).

Trabalhos recentes sugerem que a atrofia do diafragma pode estar associada à SIRS, sepse, barotrauma ou volutrauma, estando relacionado com infiltrado de células inflamatórias ou aumento de citocinas proinflamatórias (Levine, 2008).

Em seu estudo *Callahan e colaboradores* (2001) concluíram que os radicais livres claramente indicam que tanto o ON quanto o superóxido interagem para induzir as alterações vistas em proteínas contráteis nos músculos esqueléticos na sepse e que a inibição dessas vias impede essas mudanças.

1.6 SEPSE E FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF α)

As endotoxinas ativam os macrófagos que produzem citocinas como as interleucinas-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF α) (Danjo, 2008).

O TNF α é quimiotático para monócitos e neutrófilos, induzindo fagocitose, aderência dessas células ao endotélio e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Na parede endotelial ele é responsável por aumentar a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão (Harris, 1998).

Recentes evidências sugerem que o TNF α tem papel no desenvolvimento de disfunção diafragmática durante a sepse, sua administração intravenosa resultou em dano na contratilidade do diafragma em cachorros (Danjo, 2008).

A ativação do sistema imune por microorganismos leva à liberação de uma série de mediadores. Os denominados de primeira linha são TNF α , IL-1 e IL-6, todos com ação pró-inflamatória, com intuito de combater o agente infeccioso e recrutar mais células de defesa para o local da agressão (Harris, 1998).

A dificuldade em respirar com resistência é encontrada em muitas doenças, tais como a asma, DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica) e OVAS (obstrução de via aéreas superiores). Contrações diafragmáticas extenuantes associadas com resistência inspiratória também induzem uma resposta inflamatória que resulta na elevação de citocinas pró e antiinflamatória dentro do diafragma (Vassilakopoulos, 2007).

Deve ser feita uma distinção entre os efeitos locais das citocinas (efeitos parácrinos) e as conseqüências de seus altos níveis na circulação sistêmica. Os efeitos locais envolvem o recrutamento de células fagocitárias, essencial para a eliminação dos microorganismos,

enquanto que os efeitos sistêmicos causam danos ao hospedeiro. Isto é particularmente verdadeiro para o TNF α , que parece ser o mediador chave no choque séptico (Pereira Júnior et al., 1998).

Sendo assim, a sepse bacteriana e alguns mediadores inflamatórios como o TNF α , são capazes de induzir uma disfunção mitocondrial e hipóxia tecidual em órgãos vitais (Wu et al., 2002), e na busca de amenizar essa disfunção diafragmática estudos recentes, em ratos sépticos, tem testado a eficácia de alguns medicamentos como inibidores específicos da fosfodiesterase (Danjo et al., 2008).

1.7 SEPSE, MÚSCULO ESQUELÉTICO E O DIAFRAGMA

Ao longo da última década, a compreensão do modo como a sepse prejudica os músculos respiratórios tem avançado tremendamente. (Lin, 1998; Gath, 1996).

Músculos esqueléticos compreendem aproximadamente 50% da massa corporal, e sua disfunção causa anormalidades na utilização de oxigênio tecidual em grandes órgãos, que pode levar desarranjo metabólico significativo, associado à sepse (Callahan, 2005).

Os músculos respiratórios possuem um papel fundamental dentro do sistema respiratório, pois são os responsáveis por gerar força necessária para realizar as trocas gasosas (Souza, 2008).

O diafragma é um músculo esquelético e o principal músculo da respiração. Sendo um músculo inspiratório por excelência, formado por feixes musculares delgados em forma de duas cúpulas voltadas cranialmente, estando a hemicúpula esquerda sempre mais baixa que à direita (Azeredo, 2002).

É o principal músculo da ventilação, sendo responsável por 70% da respiração sendo que para alguns autores une para outros separa o abdômen do tórax. Sendo que os músculos respiratórios são músculos esqueléticos semelhantes aos periféricos, tendo em sua formação fibras do tipo I (muito resistentes à fadiga), IIa (com resistência intermediária à fadiga), IIb (pouco resistentes à fadiga) e IIc (híbridas) (Sarmiento, 2005).

Foi bem estabelecido que a sepse, endotoxemia, ou bacteremia são associadas com deterioração significativa da contratilidade dos músculos ventilatórios. Vários locais são influenciados por esta doença, inclusive a função sarcolemal, excitação-contração, e depressão da máquina contrátil (Comtois et al., 2001).

Foi documentado em modelo animal de sepse, que a disfunção diafragmática consiste em diminuição da produção de força máxima, bem como um aumento da susceptibilidade à fadiga (Ebihara et al., 2002).

Para Sarmentos (2005) vários são os motivos que levam os pacientes a UTI, sendo prática comum dentro dessas unidades, a sedação e ventilação mecânica. Esta é usada para buscar a homeostasia dos gases sanguíneos para pacientes que não tem uma boa ventilação alveolar.

É importante destacar que a partir do momento da internação do paciente na UTI, é a musculatura respiratória que mais sofre com os efeitos deletérios, sendo agravada pela série de complicações pulmonares apresentadas pelos pacientes, como o elevado número de ocorrência de infecção hospitalar e a utilização de suporte ventilatório por período prolongado (Souza, 2008).

No diafragma séptico, contrações musculares contínuas podem agravar a lesão sarcolemal (Comtois et al., 1999), levando a necessidade de sedação e ventilação mecânica.

As associações de fraqueza muscular respiratória com redução do *drive* respiratório e dano na função imunológica podem levar a hipercapnia respiratória, dificuldade no desmame do ventilador mecânico, diminuição da capacidade de tosse e conseqüentemente, maior risco de desenvolver atelectasias (Dias, 2004), aumentando o tempo de permanência nas UTI's.

Para *Azaredo* (2002), a disfunção diafragmática pode ser conceituada classicamente como a inabilidade parcial (paresia) ou total (paralisia) do paciente para contrair seu diafragma ou realizar uma inspiração profunda com volumes pulmonares razoáveis.

A hipotrofia muscular e a disfunção contrátil são mecanismos potenciais para o desenvolvimento de fraqueza muscular diafragmática, o que contribui para a incapacidade de determinados pacientes voltarem a respirar espontaneamente (Sarmiento, 2005).

A insuficiência respiratória pulmonar aguda (IRpA) é uma complicação freqüente na sepse e, cerca de 25% desenvolvem síndrome da angústia respiratória do Adulto (SARA). A IRpA pode ocorrer em 30 a 80% dos casos, dependendo da origem de sua causa (David, 2004) e tem se mostrado um dos principais contribuintes para a elevada taxa de mortalidade associada à doença. (Ebihara, et al. 2002).

Na sepse os sinais mais precoces de insuficiência respiratória são taquipnéia, hiperventilação e alcalose respiratória. As possíveis causas para essas manifestações são: o efeito direto das endotoxinas, níveis séricos elevados de catecolaminas, aumento do débito cardíaco, hipoxemia e efeitos diretos de mediadores inflamatórios no centro respiratório (David, 2004).

A IRpA é considerada a mais importante causa de morte em choque séptico, mesmo depois de corrigida as alterações hemodinâmicas. Tradicionalmente, a insuficiência respiratória é atribuída a lesões pulmonares e se manifesta nas fases iniciais do choque

séptico como hipoxemia, hipertensão pulmonar e diminuição da complacência pulmonar. Além da lesão pulmonar, há evidências crescentes de que o choque séptico é associado à insuficiência da bomba ventilatória (Hussain, 1998).

Pacientes criticamente doentes em UTI's tem severa perda de massa e função muscular prejudicada, o que atrasa o desmame do ventilador e prolonga os dias de internação, reduzindo sua qualidade de vida. Embora essa perda muscular possa estar relacionada à doença primária, esta pode ser agravada por anestésicos e modernas intervenções em Terapia Intensiva (Larsson 2007).

Os músculos respiratórios sofrem os mesmos problemas de qualquer músculo periférico, como descondicionamento, com perda da resistência, podendo levar à fadiga ou fraqueza (Sarmiento, 2005).

Um músculo esquelético periférico e de força que podemos citar é o quadríceps, localizado na região anterior da coxa, formado por quatro músculos, a saber: reto femoral, vasto medial, vasto lateral e vasto intermédio.

Hussain e colaboradores (1998) postularam que o músculo inspiratório pode falhar durante o choque séptico devido ao desequilíbrio entre demanda e abastecimento de energia.

Para *Dias e colaboradores* (2004) mesmo sem doença pulmonar, a desnutrição é outro fator que contribui para a fraqueza dos músculos respiratórios, principalmente o diafragma, apresentando diminuição de força e resistência.

Lanone e colaboradores (2005) descreveram que a diminuição da produção de força diafragmática é gerada pela diminuição da energia levada aos músculos, por essa não ser suficiente para a demanda metabólica exigida e, essa energia depende do fluxo sanguíneo

local e das condições da perfusão microvascular, bem como da capacidade das células musculares em utilizar substratos metabólicos. Sendo que logo após iniciar o processo séptico, ocorre diminuição do fluxo sanguíneo no diafragma em repouso, diferentemente da contração onde esse fluxo aumenta.

E vale ressaltar que o diafragma apresenta em sua microvasculatura um grande número de vasos sanguíneos que circunda cada fibra muscular, por volta de oito a dez por fibra, em íntima associação ao longo do músculo, assegurando assim um amplo suprimento de gases e nutrientes ao músculo (Azeredo, 2002).

Também foi demonstrado que o uso de N-acetilcisteína é efetivo em diminuir a taxa de desenvolvimento de fadiga diafragmática em coelhos, mas não apresentou efeito na recuperação do diafragma já fatigado (David, 2004).

Lin (1998) descreve que a contratilidade do diafragma pode estar prejudicada em pacientes com sepse, podendo ser um fator importante para a alta incidência de falência respiratória, sendo o suporte ventilatório freqüentemente requisitado.

O fracasso dos músculos ventilatórios em choque séptico pode ser atribuído em parte à própria infecção bacteriana, independentemente da hemodinâmica associada com o choque. Este conceito tem por base as observações de *Friman* que relata que a força máxima (a quantidade de força que um músculo pode exercer durante uma única contração) e capacidade de endurance (o tempo que um músculo pode manter um percentual fixo da sua força máxima) de vários músculos dos membros diminuíram significativamente durante infecções agudas no homem (*Hussain*, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a força do diafragma em ratos induzidos à sepse relacionando com disfunção mitocondrial.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar as alterações da força diafragmática na sepse em ratos com o auxílio de um manovacuômetro digital;
- Avaliar a geração de EROS e sua relação com a atividade da cadeia de transporte de elétrons em músculo esquelético;
- Correlacionar a disfunção diafragmática com o dano mitocondrial;
- Comparar diferenças entre disfunção mitocondrial diafragmática e quadríceps.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

SKELETAL MUSCLE ELECTRON TRANSPORT CHAIN DYSFUNCTION AFTER SEPSIS INDUCED BY CECAL LIGATION AND PERFORATION IN RATS

Peruchi BB; Petronilho F; Constantino L; Steckert AV; Cardoso MR; Gonçalves CL; Rezin
GT; Streck EL; Dal-Pizzol F.

SKELETAL MUSCLE ELECTRON TRANSPORT CHAIN DYSFUNCTION AFTER SEPSIS INDUCED BY CECAL LIGATION AND PERFORATION IN RATS

Peruchi BB¹; Petronilho¹, F; Constantino L¹; Steckert AV¹; Cardoso MR¹; Gonçalves CL¹;
Rezin GT¹; Streck EL¹; Dal-Pizzol F¹.

¹ Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88006-000, Criciúma, SC, Brazil.

Supported, in part, by UNESC (Brazil), FAPESC (Brazil), Instituto Cérebro e Mente (Brazil), CAPES (Brazil) and CNPq (Brazil).

Address to request for reprints: Prof. Felipe Dal-Pizzol, MD, PhD - Laboratório de Fisiopatologia Experimental, PPGCS, UNASAU, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000 Criciúma, SC, Brazil. E-mail: piz@unesc.net

Key Words: Sepsis, Cecal ligation and perforation, skeletal muscle, Force, Mitochondrial chain, Oxidative stress.

ABSTRACT

As the disease progresses, more organs may be affected, and approximately 10% to 15% of the patients admitted to the ICU will ultimately have multiple organ failure (MOF). Skeletal muscle comprises 50–60% of body cell mass and represents the largest organ potentially affected by systemic infection. Septic patients frequently develop skeletal muscle dysfunction. In the present study, we investigated whether sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) modifies mitochondrial respiratory activities in respiratory and non-respiratory skeletal muscle. Male adult Wistar rats were subjected to CLP. We demonstrated that alterations on diaphragm force are correlated to mitochondrial oxidative stress in the early phases of sepsis and to mitochondrial dysfunction in the late phases. Moreover, the present data would also argue that diaphragm muscle mitochondrial dysfunction may become increasingly severe several days after the initial inflammatory response (i.e., the majority of the derangements observed in the present study occurred 48 h after CLP), and this is similar to previously published data. We had previously used this model to determine hepatic mitochondrial dysfunction, and now we demonstrated diaphragm, but not quadriceps mitochondrial dysfunction, suggesting that quadriceps mitochondria are more resistant to sepsis-induced dysfunction. Understanding the mechanisms associated to this resistance could help in the development of strategies to improve mitochondrial function during sepsis development.

Key-words: sepsis; cecal ligation and puncture (CLP); diaphragm force; dysfunction mitochondrial, skeletal muscle

INTRODUCTION

Increasing evidence indicates that mitochondria play an important role in modulating the development of clinical manifestations in septic patients [2-5]. As the disease progresses, more organs may be affected, and approximately 10% to 15% of the patients admitted to the ICU will ultimately have multiple organ failure (MOF) [14]. Other of the consequences of the septic response is an impairment of oxygen extraction and utilization by peripheral tissue [10]. Mitochondrial activity accounts for 90% of total body oxygen consumption and is responsible, in most cell types, for 90% of adenosine triphosphate (ATP) generation. Thus, any derangement in oxygen utilization occurring during sepsis is likely to be linked to impaired mitochondrial functioning [17,19,30]. The consequent decrease in ATP generation may then

compromise normal cellular metabolic activity, leading to biochemical and physiologic organ dysfunction [24].

The electron transport chain consists of enzyme complexes and carrier molecules associated with the inner mitochondrial membrane. The reduced nicotinamide (NADH) and flavin adenine dinucleotides, produced mainly by oxidation of nutrients through the Krebs cycle, donate electrons to complexes I and II, respectively. Electrons then flow through complexes III and IV, transported via coenzyme Q and cytochrome C, and finally reduce oxygen to H₂O. Electron transfer through complexes I, III, and IV generates a proton gradient across the inner mitochondrial membrane that is used by ATP synthase production in this manner, even under physiologic conditions, noncoupled electron transfer can account for a significant amount of mitochondrial oxygen consumption [24]. Recent studies suggest, moreover, that sepsis-induced alterations in mitochondrial function play an important role in the genesis of the tissue injury seen in this syndrome [12], through inhibition of the electron transport chain, reductions in activity of complexes (I–IV), have each been reported to occur in sepsis [9]. The majority of the published reports that have examined mitochondrial dysfunction in sepsis have focused on the role of sepsis-induced alterations in one or more properties of the electron transport chain [6,9,15,33]. Inhibition of electron flow through the transport chain [9,11,15,32,33] and uncoupling of electron transport from ATP synthesis have been described in sepsis [6];

Skeletal muscle comprises 50–60% of body cell mass and represents the largest organ potentially affected by systemic infection [24]. Septic patients frequently develop skeletal muscle dysfunction. This dysfunction can be because of muscle weakness (decreased muscle strength), muscle fatigability (reduced capacity to continue muscle contractions), or

other causes such as acquired neuropathy. Since the diaphragm is the major muscle of respiration, respiratory failure and difficult weaning from mechanical ventilation could be precipitated by this pathophysiological mechanism, but little is known about mitochondrial function in skeletal muscle (both respiratory and non-respiratory) during sepsis development [10].

Thus, in the present study, we investigated whether sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP) modifies mitochondrial respiratory activities in respiratory and non-respiratory skeletal muscle.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male adult Wistar rats (60 days old) were obtained from UNESC (Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brazil) breeding colony. All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Cecal ligation and perforation surgery

The animals were subjected to CLP as previously described [27]. Briefly, rats were anesthetized with a ketamine (80 mg/kg), given intraperitoneally. Under aseptic conditions, a 3 cm midline laparotomy was performed to allow exposure of the cecum with the adjoining intestine. The cecum was tightly ligated with a 3.0-silk suture at its base, below the ileocecal valve, and was perforated once with a 14-gauge needle. The cecum was then gently squeezed to extrude a small amount of feces from the perforation site returned to the

peritoneal cavity, and the laparotomy was closed with 3.0-silk sutures. All animals received isotonic saline solution (50 mL/kg s.c.) immediately after and 12 h after CLP and antibiotics (ceftriaxone 30 mg/kg and clindamycin 25 mg/kg every 6 h). All animals were returned to their cages with free access to food and water. In the sham-operated group the rats were submitted to all surgical procedures and received isotonic saline solution (50 mL/kg s.c.) immediately after and 12 h after surgical procedure and antibiotics (ceftriaxone 30 mg/kg and clindamycin 25 mg/kg every 6 h) but the cecum was neither ligated nor perforated. The overall mortality in this model was 45%, in agreement with previous publications from our group [27].

The sham and CLP groups were allocated randomly during the procedure. Several times (6, 12, 24 and 48 h) after CLP or sham operation rats were killed by decapitation, diaphragm and quadriceps were immediately isolated and stored at -70 °C. Diaphragm was also used to determination of maximal inspiratory pressure (IP_{max}) as an index of diaphragm contractile force.

To minimize the possibility that animals did not truly develop sepsis the CLP procedure was always performed by the same investigators. In addition, all animals were observed after CLP to determine signs of infection (pyloerection, lethargy, tachypnea and weight loss), and the number of animals that survived is in accordance with our previous reports [26,27].

Maximal inspiratory pressure (PiMAX)

Rats were anesthetized with a ketamine and under aseptic conditions a tracheostomy was performed, a tracheal tube was inserted and IP max was measured using a digital

manovacuometer. It was recorded ten consecutive inspiratory efforts, and the mean IP_{max} was determined.

Mitochondrial respiratory chain enzymes activities

Diaphragm was homogenized (1:10, w/v) in SETH buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 IU/ml heparin, pH 7.4) for determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities (complexes I, II, II–III and IV). NADH dehydrogenase (complex I) was evaluated according to the method described by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm [13]. The activities of succinate: DCIP oxidoreductase (complex II) and succinate: cytochrome c oxidoreductase (complex II–III) were determined according to the method of [20]. Complex II activity was measured by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP) at 600 nm. Complex II–III activity was measured by cytochrome c reduction from succinate. The activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was assayed by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome c at 550 nm [28]. The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were expressed as nmol/min mg protein.

Isolation of submitochondrial particles

The diaphragm structures were homogenized (1:10, w/v) in ice-cold isolation buffer A (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0.5 mg/mL fatty-acid free bovine serum albumin, pH 7.4) and centrifuged at 2,000 x g for 10 min at 4°C. Approximately three quarter of the supernatant was further centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C in a new tube. The fluffy layer of the pellet was removed by gently shaking with buffer A and the

firmly packed sediment was resuspended in the same buffer without EGTA and centrifuged at 10,000 x *g* for 10 min at 4°C. Mitochondria pellet was resuspended in buffer B (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES-KOH, 4.2 mM succinate, 0.5 mM KH₂PO₄, 4 µg/mL rotenone, pH 7.4). This procedure yielded about 20 mg of mitochondrial protein/g of muscle. Mitochondria protein was determined by the Lowry (1951) method using bovine serum albumin as standard [23].

Submitochondrial particle lipoperoxidation and superoxide production

Lipid peroxidation was measured by the formation of TBARS during an acid-heating reaction, as previously described [18]. Briefly, the samples were mixed with 1 mL of trichloroacetic acid 10% (TCA) and 1 mL of thiobarbituric acid 0.67% (TBA), then heated in a boiling water bath for 15 min. Butanol (2:1 v/v) was added and after centrifugation at 800 x *g* for 5 min, TBARS were determined by the absorbance at 535 nm. Results are expressed as MDA (malondialdehyde) equivalents (nmol/mg protein). Superoxide anion production was determined in washed SMP using a spectrophotometric assay based on superoxide-dependent oxidation of epinephrine to adrenochrome at 37°C [1].

Statistical analysis

Data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test was significant and are expressed as mean ± standard deviation. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (version 12.0) software.

RESULTS

Mitochondrial electron transfer chain activities

No significant alteration on complex I, II and IV activities were observed in early times in the diaphragm (Figure 1). In contrast, 12 hours after CLP we demonstrated a significant diminution on complex II-III activity (Figure 1). At late times (48 h after CLP), we demonstrated a decrease in the activity of all electron transfer chain complexes (Figure 1). Differently from diaphragm, electron transfer chain in the quadriceps presented an increased activity in all complexes, 48 hours after CLP, and complex II-III and IV presented early increase in its activity (Figure 2).

Mitochondrial oxidative stress

Since oxidative stress could induces an impairment on mitochondrial function we determined superoxide mitochondrial production and mitochondrial lipoperoxidation in this model. It seemed that diaphragm mitochondria are more susceptible to oxidative stress when compared to quadriceps mitochondria. Quadriceps mitochondria, in all studied time points, did not increase TBARS and superoxide in submitochondrial particles (Figure 3 and 4). In contrast, early in the course of sepsis there was an increase in diaphragm submitochondrial particles superoxide production that is followed by a late increase in mitochondrial TBARS levels (Figure 3 and 4).

Diaphragm contractile force

As early as 6 hours after CLP animals presented decreased on diaphragm contractile force, and this was maintained until 24 hours after surgery. Thus it seemed that a decrease on contractile force occurs before any detectable alterations on mitochondrial electron

transfer chain activity. At these early times (6 hours after CLP) force negatively correlated to mitochondrial superoxide production ($r = -0.80$) suggesting that force reduction is related to oxidative stress. In contrast, when mitochondrial electron chain dysfunction occurs (12 hours after CLP, complex II-III) it positively correlates to contractile force ($r = 0.85$).

Discussion

In several animal models for severe sepsis and septic shock, decreased mitochondrial function and a consequent decrease in energy supplies in skeletal muscle have been shown [6,8,16]. In addition, decreased mitochondrial function in skeletal muscle of patients with septic shock was also demonstrated (Singer, 2007). However, the differences between respiratory and non-respiratory muscle were not adequately addressed in the literature. We here demonstrated that, in a well-established animal model of sepsis with the use of antibiotics and fluid resuscitation, diaphragm mitochondria are more susceptible to dysfunction, when compared to the quadriceps. In addition, we demonstrated that alterations on diaphragm force are correlated to mitochondrial oxidative stress in the early phases of sepsis and to mitochondrial dysfunction in the late phases. These results are somewhat different from a human study that demonstrated a compromised mitochondrial content in both respiratory and leg muscle of critically ill patients with dysfunction of multiple organs. Clearly, in human studies, several confounding factors, like mechanical ventilation, sedation, could account to the observed results.

The alterations observed in diaphragm mitochondria are somewhat similar to that we observed in the liver during sepsis, i.e. an early increase on superoxide production and a late

alteration in the electron transfer chain [10]. Moreover, the present data would also argue that diaphragm muscle mitochondrial dysfunction may become increasingly severe several days after the initial inflammatory response (i.e., the majority of the derangements observed in the present study occurred 48 h after CLP), and this is similar to previously published data. Mitochondria produce energy for basal metabolism in all, tissues. In skeletal muscle, the mitochondrial energy production is the rate-limiting step during endurance activity. It is therefore likely that the decreased mitochondrial activity could lead to the muscle fatigue observed in ICU patients and during weaning of the ventilator, decreased endurance capacity is causing problems. In a study carried through in septic rats it was possible to observe a significant reduction of the maximum muscular contraction and force-frequency of the diaphragm between 10 and 12 hours after the induction for CLP when compared to sham, followed of increase in the fatigue that occurs in the first 4 hours [22]. Sepsis-related reductions in skeletal muscle force generating capacity appear to be free radical-mediated, since administration of either ONS inhibitors or free radical scavengers prevents reductions in muscle strength in this condition [5,28,30].

In contrast, we could not observe any increase in superoxide production nor alterations in electron transfer chain activity in the quadriceps. To the best of our knowledge this is the first demonstration of an organ-system that did not present mitochondria dysfunction after sepsis. Previously, it was demonstrated mitochondrial dysfunction in the brain, liver, heart, kidney, bowel after sepsis [14]. Even in the skeletal muscle, mainly in the myocardium, mitochondrial dysfunction was previously observed, but our results did not support quadriceps mitochondrial dysfunction. As we demonstrated here, Porta and cols demonstrated that after

endotoxin administration the respiratory control rate did not alter in skeletal muscle [24]. Our results could be secondary to rat immobilization after the CLP procedure, but after 12-24 hours animals presented a normal locomotor activity. In addition, it is possible that the administration of antibiotics and fluid resuscitation could decrease sepsis severity leading to a preservation of mitochondrial function in the quadriceps. It was previously demonstrated in animal and human skeletal muscle that mitochondrial dysfunction occurs in time- and severity dependent manner during sepsis [7,8].

None of the studies that previously determined mitochondrial dysfunction used the model described here, and this could account to the observed differences. We had previously used this model to determine hepatic mitochondrial dysfunction, and now we demonstrated diaphragm, but not quadriceps mitochondrial dysfunction, suggesting that quadriceps mitochondria are more resistant to sepsis-induced dysfunction. Understanding the mechanisms associated to this resistance could help in the development of strategies to improve mitochondrial function during sepsis development.

REFERENCES

- 1- Arnaiz SL; Coronel MF; Boveris A. Nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide production in brain mitochondria after haloperidol treatment. **Nitric Oxide** 3(3): 235-43. 1999.
- 2- Banwell BL; Mildner RJ; Hassall AC; Becker LE; Vajsar J; Shemie SD. Muscle weakness in critically ill children. **Neurology** 61: 1779–1782. 2003.

- 3- Barazzoni R. Skeletal muscle mitochondrial protein metabolism and function in ageing and type 2 diabetes. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 7: 97–102. 2004.
- 4- Berg HE; Dudley GA; Hather B; Tesch PA. Work capacity and metabolic and morphologic characteristics of the human quadriceps muscle in response to unloading. **Clin Physiol** 13: 337–347. 1993.
- 5- Boczkowski J; Lanone S; Ungureanu-longrois D; Danialou G; Fournier T; Aubier M. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin administration in rats: role on diaphragmatic contractile dysfunction. **J. Clin. Invest.** 98:1550–1559.1996.
- 6- Boczkowski J; Lisdero CL; Lanone S; Samb A; Carreras C; Boveris A; Aubier M; Poderoso J. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. **FASEB J** 13: 1637– 1647. 1999.
- 7- Brealey D; Brand M; Hargreaves I; Heales S; Land J; Smolenski R; Davies NA; Cooper CE; Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. **Lancet** 360:219–223. 2002.
- 8- Brealey D; Karyampudi s; Jacques TS; Novelli M; Stidwill R; Taylor V; Smolenski RT; Singer M. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 286:R491–R497. 2004.
- 9- Callahan LA; Stofan D; Szweda L; Nethery D; Supinski GS. Free radicals alter maximal diaphragmatic oxygen consumption in endotoxininduced sepsis. **Free Radic Biol Med** 30: 129–138. 2001a.
- 10- Callahan LA; Nethery D; Stofan D; Dimarco A; Supinski G. Free Radical–Induced Contractile Protein Dysfunction in Endotoxin-Induced Sepsis. **American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology** 24: 210–217. 2001b.

- 11- Callahan LA; Supinski GS. Sepsis induces diaphragm electron transport chain dysfunction and protein depletion. **Am J Respir Crit Care Med** 172: 861–868. 2005.
- 12- Callahan LA; Supinski GS. Diaphragm and cardiac mitochondrial creatine kinases are impaired in sepsis. **J Appl Physiol** 102(1):44-53. 2007.
- 13- Cassina A; Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch. Biochem. Biophys.** 328: 309-316. 1996.
- 14- Cowley RA; Mergner WJ; Fisher RS; Jones RT; Trump BF. The subcellular pathology of shock in trauma patients: studies using the immediate autopsy. **Am Surg** 45:255-69. 1979.
- 15- Crouser ED; Julian MW; Dorinsky PM. Ileal VO₂-DO₂ alterations induced by endotoxin correlate with severity of mitochondrial injury. **Am J Respir Crit Care Med** 160: 1347–1353. 1999.
- 16- Crouser ED; Julian MW; Blaho DV; Pfeiffer DR. Endotoxin induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. **Critical Care Medicine** 30: 276–284. 2002.
- 17- Crouser ED: Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. **Mitochondrion** 4:729–741. 2004.
- 18- Draper HH; Hadkey M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol** 186: 421–431. 1990.
- 19- Fink MP: Cytopathic hypoxia: Is oxygen use impaired in sepsis as a result of an acquired intrinsic derangement in cellular respiration? **Crit Care Clin** 18:165–175. 2002.
- 20- Flischer JC; Ruitenbeek W; Berden JA; Trijbels JM; Veerkamp JH; Stadhouders AM; Sengers RC; Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin. Chim. Acta** 153: 23-26. 1985.

- 21- Fredriksson K; Hammarqvist F; Strigard K; Hultenby K; Ljungqvist O; Wernerman J; Rooyackers O. Derangements in mitochondrial metabolism in intercostal and leg muscle of critically ill patients with sepsis-induced multiple organ failure. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 291: E1044–E1050. 2006.
- 22- Fujimura N, Sumita S, Aimonio M, Masuda Y, Shichinohe Y, Narimatsu E, Namiki A. Effect of Free Radical Scavengers on Diaphragmatic Contractility in Septic Peritonitis. **Am J Respir Crit Care Med** 162: 2159–2165. 2000.
- 23- Lowry OH; Rosebough NG; Farr AL; Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275. 1951
- 24- Porta F; Takala J; Weikert C; Bracht H; Kolarova A; Lauterburg BH; Borotto E; Jakob SM. Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. **Critical Care** 10:118. 2006.
- 25- Protti A; Carré J; Frost MT; Taylor V; Stidwill R; Rudiger A; Singer M. Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. **Crit Care Med** 35 (9): 2150-2155. 2007.
- 26- Ritter C; Andrades M; Frota ML; Bonatto F; Pinho RA; Polydoro M; Klamt F; Pinheiro CT; Menna-barreto S; Moreira JF; Dal-pizzol F. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. **Intensive Care Medicine** 29:1782–1789. 2003.
- 27- Ritter C; Andrades ME; Reinke A; Menna-barreto S; Moreira JC; Dal-pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Critical Care Medicine** 32: 342-349. 2004.

- 28- Rustin P; Chretien D; Bourgeron T; Gerard B; Rotig A; Saudubray JM; Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clin. Chim. Acta** 228: 35-51. 1994.
- 29- Shindoh C; Dimarco A; Nethery D; Supinski G. Effect of PEG-superoxide dismutase on the diaphragmatic response to endotoxin. **Am. Rev. Respir. Dis.** 145:1350–1354. 1992.
- 30- Singer M; Brealey D. Mitochondrial dysfunction in sepsis. **Biochem Soc Symp** 66: 149–166. 1999.
- 31- Supinski G; Nethery D; Nosek TM; Callahan LA; Stofan D; Dimarco A. Endotoxin administration alters the force vs. pCa relationship of skeletal muscle fibers. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 278:R891–R896. 2000.
- 32- Taylor DE; Piantadosi CA. Oxidative metabolism in sepsis and sepsis syndrome. **J Crit Care** 10: 122–135. 1995.
- 33- Trumbeckaite S; Poalka JR; Neuhof C; Zierz S; Gellerich FN. Different sensitivity of rabbit heart and skeletal muscle to endotoxin-induced impairment of mitochondrial function. **Eur J Biochem** 268: 1422–1429. 2001.

LEGENDS

Figure 1 - Effect of antioxidants on mitochondrial respiratory chain in the quadriceps of rats after sepsis induced by CLP. Values are expressed as mean \pm S.D. for five independent experiments. Activity measuring in **(A)** Complex I, **(B)** Complex II, **(C)** Complex II-III, **(D)** Complex IV. * $p < 0.05$; Different from sham group, (One-way ANOVA followed by Tukey).

Figure 2 - Effect of antioxidants on mitochondrial respiratory chain in the diaphragm of rats after sepsis induced by CLP. Values are expressed as mean \pm S.D. for five independent experiments. Activity measuring in **(A)** Complex I, **(B)** Complex II, **(C)** Complex II-III, **(D)** Complex IV. * $p < 0.05$; Different from sham group, (One-way ANOVA followed by Tukey).

Figure 3 - Diaphragm thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content from rats (2 months old; Sham, $n = 5$; CLP, $n = 5$;) death in 6, 12, 24 and 48 h after induction. Results are expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents per milligram of protein. Values are the mean \pm SD. * $p < 0.05$; Different from sham group, in this hour.

Figure 4 - Quadriceps thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content from rats (2 months old; Sham, $n = 5$; CLP, $n = 5$;) death in 6, 12, 24 and 48 h after induction. Results are expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents per milligram of protein. Values are the mean \pm SD. * $p < 0.05$; Different from sham group, in this hour.

Figure 5 - The effects of sepsis after 6, 12, 24 and 48h at the superoxide anion production in submitochondrial particles of diaphragm rats. Values are expressed as mean \pm S.D. for five independent experiments. * $p < 0.05$; Different from sham group, in this hour.

Figure 6 - The effects of sepsis after 6, 12, 24 and 48h at the superoxide anion production in submitochondrial particles of quadriceps rats. Values are expressed as mean \pm S.D. for five independent experiments. * $p < 0.05$; Different from sham group, in this hour.

FIGURE 1

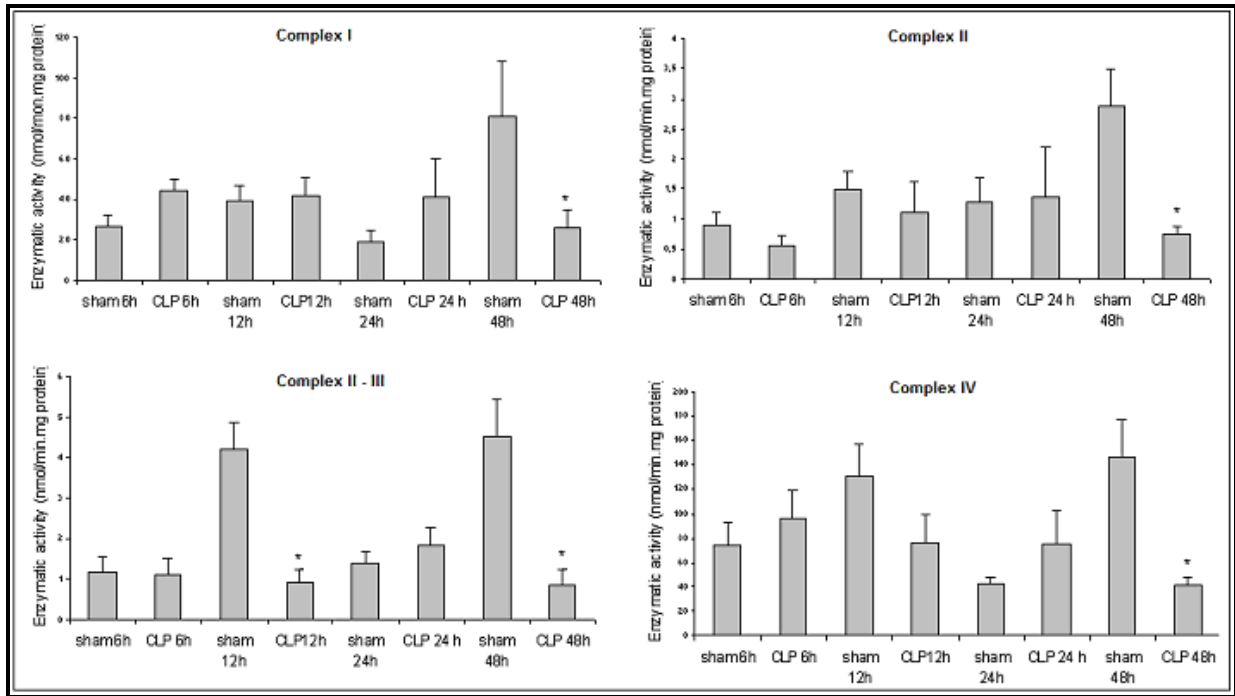


FIGURE 2

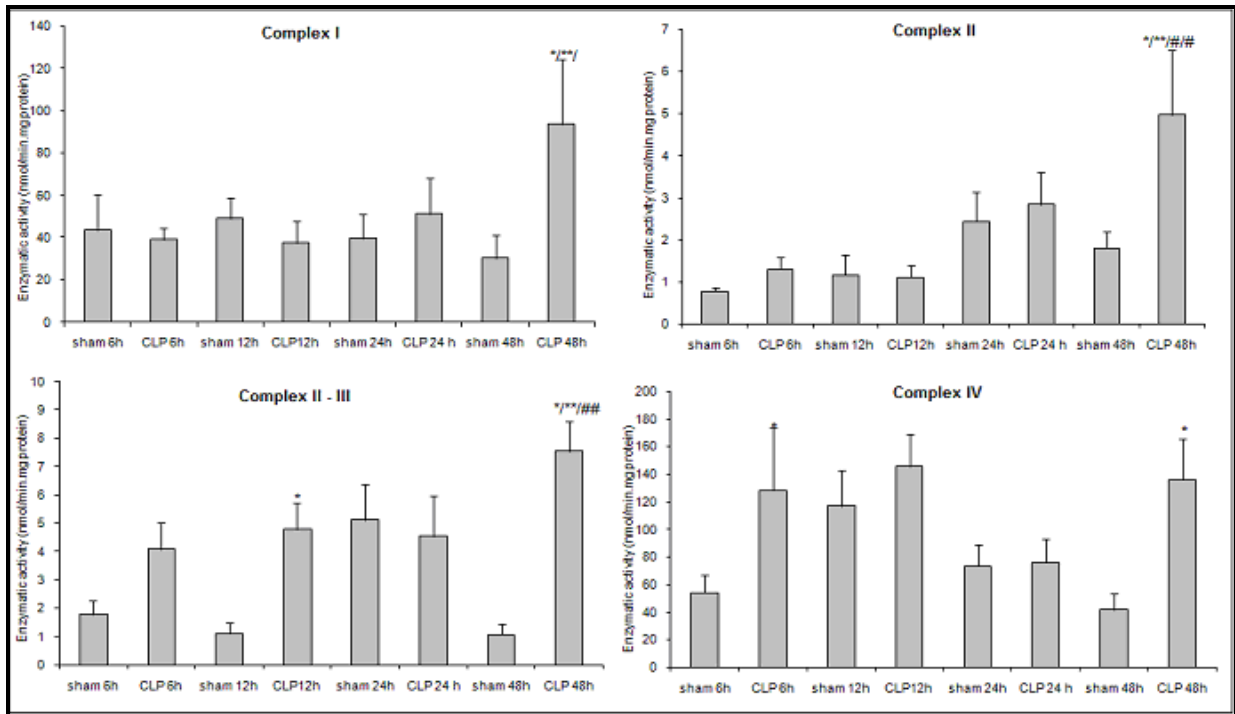


FIGURE 3

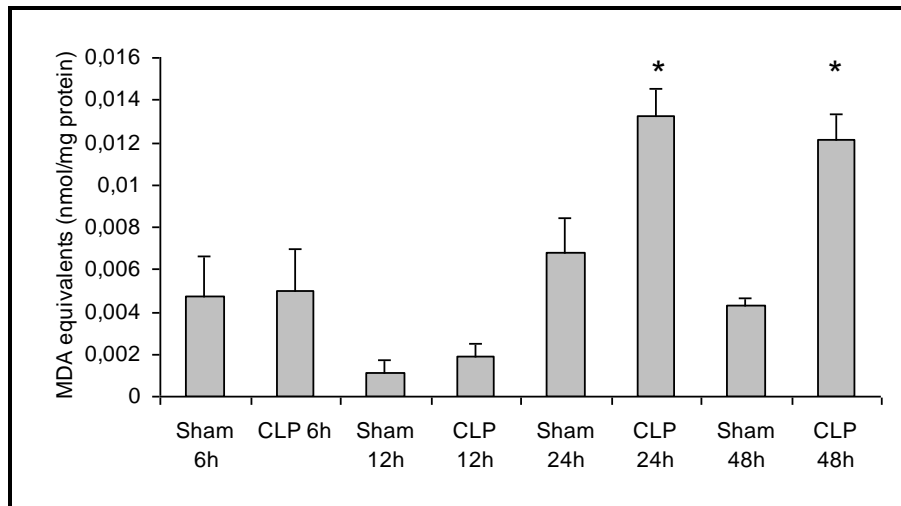


FIGURE 4

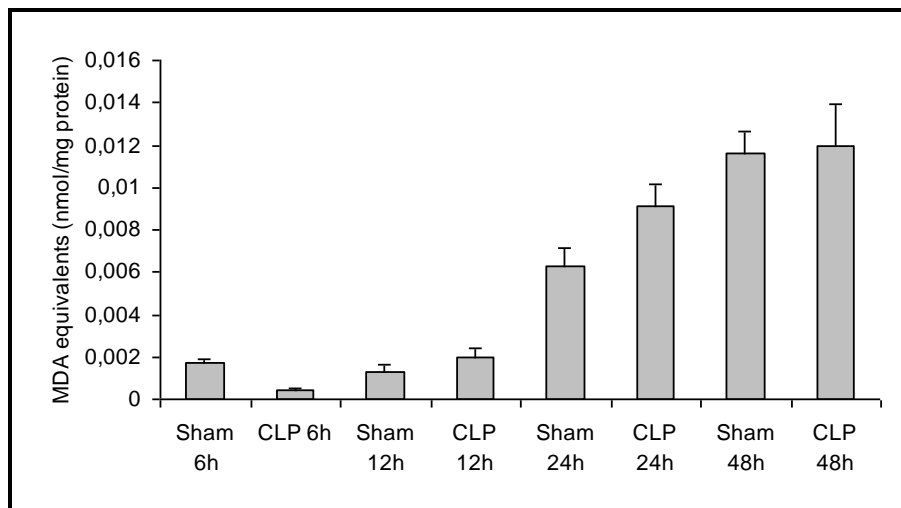


FIGURE 5

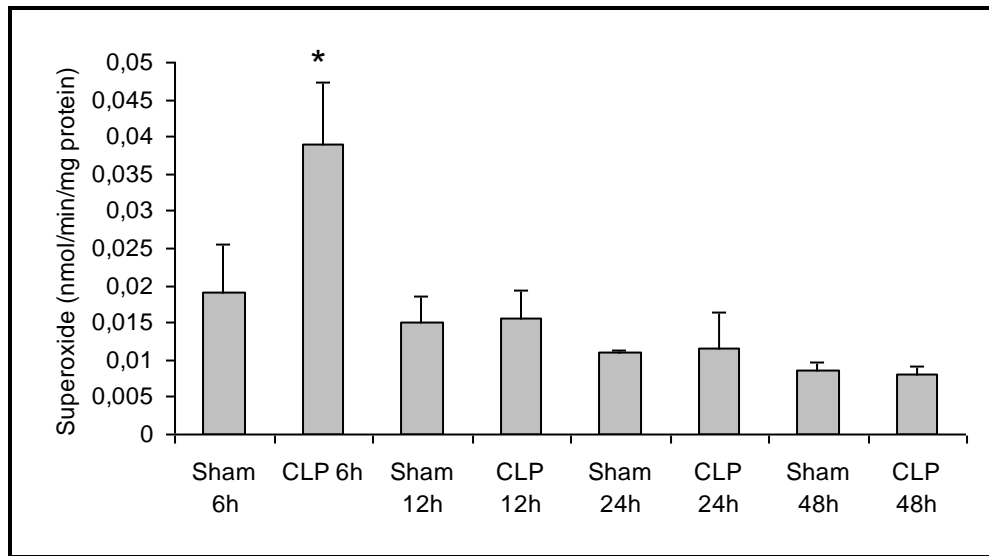
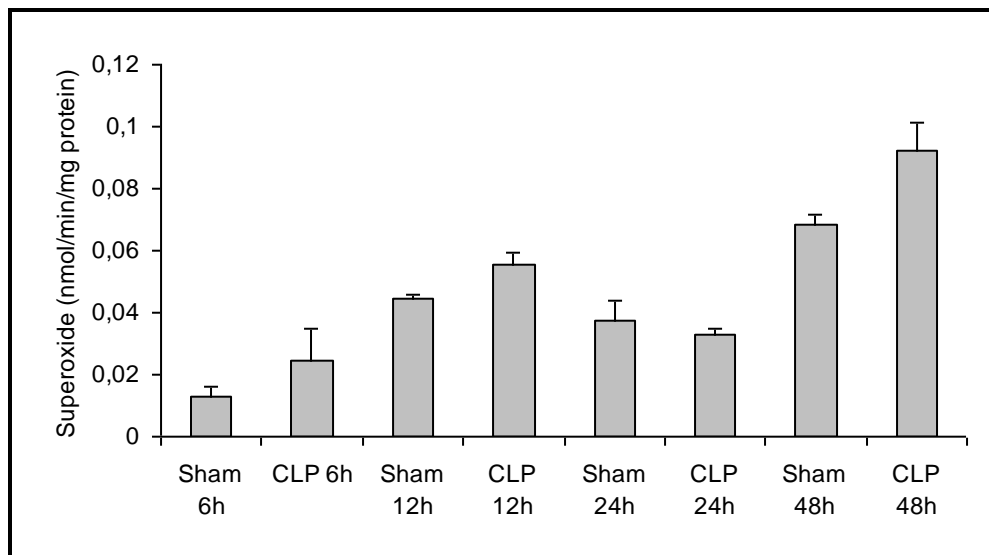


FIGURE 6



4. DISCUSSÃO

Estudos recentes indicam que a sepse resulta na redução da capacidade do músculo esquelético em gerar contração. O diafragma, que é um músculo esquelético, tem a responsabilidade de se contrair para propiciar uma adequada ventilação aos pulmões. Mesmo sendo muito resistente a fadiga, pode não suportar determinada sobrecarga, levando o paciente à insuficiência ventilatória, ocasionando insuficiência respiratória aguda. Num quadro séptico, o dano muscular pode estar relacionado ao cálcio, à geração de radicais livres, ao TNF- α , à disfunção mitocondrial, à lesão sarcolemal, à polineuropatia, à síndrome da imobilidade no leito, perda de proteínas além de outras situações. Trabalhos recentes sugerem que a atrofia do diafragma pode estar associada à SIRS, sepse, barotrauma ou volutrauma, estando relacionada com infiltrado de células inflamatórias ou aumento de citocinas proinflamatórias (Levine, 2008).

Diversas evidências demonstram presença de disfunção diafragmática na sepse. Foi documentado em modelo animal de sepse, que a disfunção do diafragma consiste em diminuição da produção de força máxima, bem como um aumento da susceptibilidade à fadiga (Ebihara et al, 2002). *Danjo e colaboradores* (2008) demonstraram em um de seus trabalhos que a contratilidade diafragmática foi prejudicada depois da administração da endotoxina. Cohen e colaboradores (1982) descreveram como a eletromiografia evidenciou a falha da contratilidade do diafragma em pacientes com insuficiência respiratória aguda na sepse severa e com isso, não podiam ser desmamados da ventilação mecânica (Hussain, 1998).

Alguns mecanismos são propostos para esta disfunção. *Levine* (2008) sugere que o aumento da proteólise causa atrofia e quando bloqueadas as vias de proteólises de diafragmas de pacientes em ventilação mecânica podem facilitar o desmame da ventilação artificial. *Hussain e colaboradores* (1998) observaram o desenvolvimento de insuficiência respiratória hipercápnica aguda em pacientes com choque séptico, na presença de pO_2 arterial normal.

Além disto, foram estudados 28 pacientes em uma coorte que analisaram tecido muscular nas primeiras horas após a sepse. Foi observada diminuição da atividade do complexo I e baixa concentração de ATP tecidual, 24 horas após o diagnóstico de sepse em 12 pacientes. Complexo I da cadeia respiratória parece ser a enzima mais afetada durante o processo da sepse em humanos com choque séptico em órgãos periféricos (*Brealey et al.*, 2002). O Complexo I é sensível aos efeitos do óxido nítrico. Em um estudo recente, mostrou severa redução da função mitocondrial em músculos esqueléticos em muitos pacientes criticamente doentes com sepse, sendo um preditor para o aumento da mortalidade (*Callahan*, 2005).

Em nosso trabalho não se observou alteração significativa do complexo I no músculo diafragma, nem na atividade dos complexos II e IV em tempos precoces após a sepse. Em contraste, em 12 horas após CLP ocorreu uma significativa diminuição na atividade do complexo II-III. Porém, num tempo mais prolongado, 48h após CLP, houve uma diminuição na atividade de todos os complexos. Diferentemente do diafragma, a cadeia de transportes de elétrons no quadríceps aumentou em todos os complexos, em 48 após CLP, e nos complexos II-III e IV um pequeno aumento na atividade.

Sabemos que a formação de EROS é em grande parte resultando do desvio dos elétrons do complexo I quando este encontrasse alterado, e também podemos dizer que a mitocôndria do diafragma sofre mais com estresse oxidativo do que a mitocôndria do quadríceps. Encontramos o mesmo resultado descrito na literatura sobre estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Não houve aumento de TBARS e superóxido em mitocôndria de quadríceps. Já no diafragma, no início da sepse observamos aumento na produção de superóxido submitocondrial, seguido por um aumento tardio de TBARS. O entendimento dos mecanismos responsáveis por estas diferenças certamente é de importância no desenvolvimento de estratégias para reduzir disfunção mitocondrial em pacientes com sepse.

Sobre força diafragmática em ratos já foram realizados estudos com eletromiografia, estimulação nervosa e até também, a retirada do diafragma e mensurada sua força por tensiômetro. Em nosso trabalho avaliamos a força do diafragma de ratos sépticos diferentemente das demais publicações. Utilizamos o manovacuômetro digital, o qual é muito utilizado na prática clínica, à beira do leito, com pacientes em ventilação mecânica. Em nosso trabalho confirmamos que a sepse causa disfunção diafragmática (redução da força de contração), manifestada pelos valores baixos obtidos com o manovacuômetro.

A diferença de dano entre o diafragma e o quadríceps pode estar relacionada ao desuso ou não. Em pacientes de UTI que ficam restritos ao leito temos trabalhos que indicam que o uso de ventilação mecânica (VM) reduz a lesão sarcolemal e com isso pode minimizar o risco de atrofia do mesmo. Em nosso trabalho não utilizamos VM e observamos um dano maior ao diafragma quando comparado com o quadríceps, pois os ratos CPL ficaram imóveis, mas respirando, ou seja, usando ativamente o diafragma. *Contois e colaboradores* (2001) demonstraram que a sepse induzida pela injeção de LPS ou ligação e perfuração

cecal (CLP) em ratos causaram dano sarcolemal mais grave nos músculos ventilatórios que nos músculos dos membros e coincidiu com o aumento nos níveis de IONS nesses músculos. A constatação de que o grau de lesão sarcolemal em animais com sepse foi significativamente reduzido quando inibidores de ONS foram infundidos, levou a conclusão de que NO, desempenha um papel na manutenção da integridade sarcolemal.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, foi demonstrada uma considerável disfunção de força diafragmática que ocorre de forma precoce após a sepse induzida por CLP.

Na tentativa de explicar essa diminuição na força muscular foi observada alteração na função mitocondrial que acometeu de diferentes formas quadríceps e diafragma atuando de forma mais severa neste músculo respiratório.

Como a atividade dos complexos se mostrou alterada, investigamos a produção de radicais livres, como o ânion superóxido e verificamos um aumento na sua produção no grupo de animais sépticos, indicando que a possível disfunção mitocondrial ocorreu em virtude da ação do radical superóxido, conhecido por causar dano a macromoléculas.

Para avaliar se as EROs e mais especificamente o radical superóxido, causaram dano ao diafragma e quadríceps avaliamos a formação de malondialdeído um produto resultante da peroxidação lipídica que demonstra dano celular por alterar a permeabilidade da membrana plasmática, e que se mostrou evidente grupo de animais com sepse.

Portanto, esse trabalho serve como uma evidencia de que o dano muscular observado na sepse pode ocorrer em decorrência da produção aumentada de EROs, que acarretam em dano oxidativo e mitondrial.

6. REFERÊNCIAS

AMES BN; SHIGENAGA MK; HEGEN TM; Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90: 7915-7922. 1993.

AZEREDO CAA; **Fisioterapia Respiratória Moderna** (Azeredo CCA, Ed.). Manole, São Paulo, PP. 505. 2002.

BERG D; YODIM MBH; RIEDERER P; Redox Imbalance. **Cell Tissue Research** 318: 201-213; 2004.

BOZZA FA; BOZZA PT; FARIA NETO HC; Beyond sepsis pathophysiology with cytokines: what is their value as biomarkers for disease severity? **Mem Inst Oswaldo Cruz** 100: 217-221. 2005.

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** 30: 129–138. 2001a.

CALLAHAN LA; NETHERY D; STOFAN D; DIMARCO A; SUPINSKI G; Free Radical-Induced Contractile Protein Dysfunction in Endotoxin-Induced Sepsis. **Am J Respir Cell Mol Biol** 24: 210–217. 2001b.

CALLAHAN LA; SUPINSKI G; Sepsis Induces Diaphragm Electron Transport Chain Dysfunction and Protein Depletion. **Am J Respir Crit Care Med** 172: 861–868. 2005.

COMTOIS A; BARREIRO E; HUANG P; MARETTE A; PERRAULT M; HUSSAIN SNA; Lipopolysaccharide-induced Diaphragmatic Contractile Dysfunction and Sarcolemmal Injury in Mice Lacking the Neuronal Nitric Oxide Synthase. **Am J Respir Crit Care Med** 163: 977–982. 2001.

COHEN CA; ZAGELBAUM G; GROSS D; ROUSSOS C; MACKLEM PT; Clinical manifestations of inspiratory muscle fatigue. **Am J Med Sep,73 (3):308-16; 1982.**

COWLEY RA; MERGNER WJ; FISHER RS; JONES RT; TRUMP BF; The subcellular pathology of shock in trauma patients: studies using the immediate autopsy. **Am Surg** 45:255-69. 1979.

CROUSER ED; JULIAN MW; DORINSKY PM; Ileal VO₂-O₂ alterations induced by endotoxin correlate with severity of mitochondrial injury. **Am J Respir Crit Care Med** 160:1347-1353. 1999.

CROUSER ED; Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. **Mitochondrion** 4: 729–741. 2004.

DANJO W; FUJIMURA N; UJIKE Y; Effect of pentoxifylline on diaphragmatic Contractility in septic rats. **Acta Medica Okayama** 62(2):101-7. 2008.

DAS UN; Critical advances in septicemia and septic shock, **Crit Care** 4: 290-296, 2000.

DAVID CM; Medicina Intensiva. **Revinter**, Rio de janeiro, pp.1160. 2004.

DAVID CM; NETO HCF; Sepsis: da bancada à beira do leito. **Revinter**, Rio de Janeiro, pp.376. 2007.

D'AVILA JCP; SANTIAGO APSA; AMÂNCIO RT; GALINA A; OLIVEIRA MF; BOZZA FA; Sepsis induces brain mitochondrial dysfunction. **Crit Care Med** 36: 1925-1932. 2008.

EBIHARA S; HUSSAIN SA; DANIALOU G; CHO W; GOTTFRIED S; PETROF B; Mechanical Ventilation Protects against Diaphragm Injury in Sepsis - Interaction of Oxidative and Mechanical Stresses. **Am J Respir Crit Care Med** 165: 221-228. 2002.

FUJIMURA N; SUMITA S; AIMONO M; MASUDA Y; SHICHINOHE Y; NARIMATSU E; NAMIKI A; Effect of Free Radical Scavengers on Diaphragmatic Contractility in Septic Peritonitis. **Am J Respir Crit Care Med** 162: 2160-2165. 2000.

GATH I; CLOSS EI; GODTELARMBRUST U; SCHMITF S; NAKANE M; WESSLER I; FORSTERMANN U; Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. **FASEB J** 10: 1614-1620. 1996.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC; Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed., **Oxford University Press**; 2006.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC; Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys** 246: 501-14. 1986.

HARRIS MC; KILPATRICK L; Cytokines and the inflammatory response. In: Polin RA, Fox WW. **Fetal and Neonatal physiology**. Philadelphia: WB Saunders Company 1967-1979, 1998.

HEALES SJ; BOLANOS JP; STEWART VC; BROOKES PS; LAND JM; CLARK JB; Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochim Biophys Acta** 1410:215-28. 1999.

HEINEN P; SOUTO A; OLIVEIRA J; Estudo das Alterações Mitocondriais Provocadas na Sepse por Espectroscopia de Infravermelho pela Transformada de Fourier e Refletância Total Atenuada. Tese de Mestrado. **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**. 2006.

HUSSAIN SNA; Respiratory muscle dysfunction in sepsis. **Mol Cell Biochem** 179: 125–134. 1998.

JOSHI MS; JULIAN MW; HUFF JE; BAUER JA; XIA Y; CROUSER ED; Calcineurin regulates myocardial function during acute endotoxemia. **Am J Respir Crit Care Med** 173: 999-1007. 2006.

KILPATRICK SL; ERECINSKA M; SILVER IA; Early cellular responses in vitro to endotoxin administration. **Circ Shock** 8:585–600. 1981.

KNOBEL E; **Condutas no Paciente Grave**. Segunda Edição, Atheneu, Rio de Janeiro, pp.3124. 1998.

LANONE S; TAILL C; BOCZKOWSKI J; AUBIER M; Diaphragmatic fatigue during sepsis and septic shock. **Intensive Care Med** 31:1611–1617. 2005.

LARSSON L; Experimental animal models of muscle wasting in intensive care unit patients. **Crit Care Med** 35: 484-487. 2007.

LEVINE S; NGUYEN T; TAYLOR N; FRISCIA M; BUDAK M; ROTHENBERG P; ZHU J; SACHDEVA R; SONNAD S; KAISER L; RUBINSTEIN N; POWERS S; SHRAGER J; Rapid Disuse Atrophy of Diaphragm Fibers in Mechanically Ventilated Humans. **N Engl J Med** 358: 1327- 1335. 2008.

LIN M; EBIHARA S; DWAIRI Q; HUSSAIN S; YANG L; GOTTFRIED S; COMTOIS A; PETROF B; Diaphragm Sarcolemmal Injury Is Induced by Sepsis and Alleviated by Nitric Oxide Synthase Inhibition. **Am J Respir Crit Care Med** 158: 1656–1663. 1998.

MATOS GF; VICTORINO JÁ; **Consenso Brasileiro de Sepse: Critérios para o Diagnóstico de Sepse, Sepse Grave e Choque Séptico.** 2003

NAVARRO A; BOVERIS A; The mitochondrial energy transduction system and the aging process. **Am J Physiol Cell Physiol** 292: 670–686. 2007.

NELSON DL; COX MM. **Lehninger Principles of Biochemistry.** Terceira edição, Worth Publishers, New York, pp.1100. 2000.

PEREIRA JÚNIOR GA; MARSON F; ABEID M; OSTINI FM; SOUZA S; BASILE-FILHO A; **Fisiopatologia da Sepse e suas Implicações Terapêuticas.** Simpósio: MEDICINA INTENSIVA: I. INFECÇÃO E CHOQUE – Capítulo II 31: 349-362.1998.

PARREIRA VF; FRANÇA DC; ZAMPA CC; FONSECA MM; TOMICH GM; BRITTO RR; Pressões respiratórias máximas: valores encontrados e preditos em indivíduos saudáveis. **Revista Brasileira de Fisioterapia** 11: 361-368. 2007.

PROTTI A; CARRÉ J; FROST MT; TAYLOR V; STIDWILL R; RUDIGER A; SINGER M; Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. **Crit Care Med** 35 (9): 2150-2155. 2007.

REINHART K; KARZAI W; Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. **Crit Care Med** 29:s121-s125, 2001.

RITTER C; ANDRADES M; FROTA ML; BONATTO F; PINHO RA; POLYDORO M; KLAMT F; PINHEIRO CT; MENNA-BARRETO S; MOREIRA JF; DAL-PIZZOL F; Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. **Int Care Med** 29:1782–1789. 2003.

RITTER C; ANDRADES ME; REINKE A; MENNA-BARRETO S; MOREIRA JC; DAL-PIZZOL F; Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Crit Care Med** 32: 342-349. 2004.

ROVER JÚNIOR L; HÖEHR NF; VELLASCO AP; Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim Nova** 24: 112-119. 2001.

SALLES MJC; SPROVIERI SRS; BEDRIKOW R; PEREIRA AC; CARDENUTO SL; AZEVEDO PRC; SILVA TM; GOLIN V; Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis – revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Rev Ass Med Brasil** 45(1): 86-92;1999.

SARMENTO G; **Fisioterapia Respiratória no Paciente Crítico** (Sargento G, ed). Ed. Manole, pp. 98-101. Capítulo 14. 2005.

SILVA E; OTHERO J; SOGAYAR A; **Consenso brasileiro de sepsis e disfunção de múltiplos órgãos**. Disponível em: <http://www.einstein.br/sepsis/pdf/2.htm>. Acessado em: 18/8/2003.

SILVA E; **Sepsis Manual** (Silva E, ed). Primeira edição. Atheneu, Rio de Janeiro, pp.122. 2006.

SMITH C; MARKS AD; LIEBERMAN, M; Marks'Basic Medical Biochemistry – A clinical approach. Second edition; **Lippincott Williams and Wilkins** 900 pag; 2004.

SZABO C; Role of nitric oxide in endotoxic shock: An overview of recent advances. **Ann N Y Acad Sci** 30: 422-425, 1998.

SOUZA LCD; In: **Fisioterapia Intensiva** (Souza LCD, ed). Primeira edição. Atheneu, Rio de Janeiro, pp. 504. 2008.

SUPINSKI GS; CALLAHAN LA.; Hemin prevents cardiac and diaphragm mitochondrial dysfunction in sepsis. **Free Radic Biol Med** 40:127–137. 2006.

VASSILAKOPOULOS T; HUSSAIN SNA.; Ventilatory muscle activation and inflammation: cytokines, reactive oxygen species, and nitric oxide. **J Appl Physiol** 102: 1687–1695. 2007.

VOET D; VOET JG; In: **Biochemistry** (Voet D, ed) Segunda edição. John Wiley & Sons, New York, pp.214. 1995.

WANG H; BLOOM O; ZHANG M; VISHNUBHAKAT JM; OMBRELLINO M; CHE J; FRAZIER A; YANG H; IVANOVA S; BOROVIKOVA L; MANOGUE KR; FAIST E; ABRAHAM E; ANDERSSON J; ANDERSSON U; MOLINA PE; ABUMRAD NN; SAMA A; TRACEY KJ; HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. **Science** 285: 248-251, 1999.

WALLACE DC; Mitochondrial Diseases in Man and mouse. **Science** 283(5407):1482-8. 1999.

WU RQ; XU YX; SONG XH; CHEN LJ; MENG XJ; Relationship between cytokine Mrna expression and organ damage following cecal ligation and puncture. **World Journal of Gastroenterology** 8:131-4. 2002.

ZHANG H; SLUTSKY AS; VICENT JL; Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. **Intensive Care Med** 26: 474-476, 2000.