

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

LÍVIA TEIXEIRA

**PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA BIOGÊNESE DE  
CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E ALTERAÇÕES OXIDATIVAS DE SEUS  
COMPONENTES DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL**

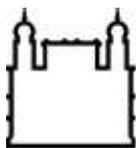
Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Biologia Celular e Molecular

**Orientador (es):** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Torres Bozza

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rossana Correa Netto de Melo

**RIO DE JANEIRO**

2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

AUTOR: LÍVIA TEIXEIRA

### **PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NA BIOGÊNESE DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E ALTERAÇÕES OXIDATIVAS DE SEUS COMPONENTES DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL**

**ORIENTADOR (ES):** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Torres Bozza

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rossana Correa Netto de Melo

**Aprovada em: 10/10/2016**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Francisco Rafael Martins Laurindo

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.** Christianne Bandeira de Melo

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.** Maria Cristina Vidal Pessolani

**Prof. Dr.** Marcus Fernandes de Oliveira

**Prof. Dr.** Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto

Rio de Janeiro, 10 de Outubro de 2016

Teixeira, Livia .

Papel das espécies reativas de oxigênio na biogênese de corpúsculos lipídicos e alterações oxidativas de seus componentes durante a sepse experimental / Livia Teixeira. - Rio de Janeiro, 2016.  
120 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Orientadora: Patrícia Torres Bozza.

Co-orientadora: Rossana Correa Netto Melo.

Bibliografia: f. 94-120

1. Sepse. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Corpúsculos lipídicos. 4. Disfunção mitocondrial. 5. NADPH oxidase. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Ciência, meu rapaz, é composta de erros, mas erros úteis de cometer, porque levam pouco a pouco à verdade”.

Júlio Verne - Viagem ao centro da terra

## **AGRADECIMENTOS:**

Agradeço a Jeová Deus por ter me dado vida e força para realizar este trabalho e por permitir aprender sobre as maravilhosas obras dos hábeis dedos Teus.

Agradeço a minha mãe Ana Lúcia e ao meu pai Klinger pelo amor incondicional e apoio irrestrito. Sei que muitas vezes o meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados por vocês, por tudo não tenho palavras para agradecer. Amo muito vocês!

À Dr<sup>a</sup>. Patrícia Bozza pelo exemplo de ética, dedicação e competência. Por ter-me auxiliado com tantas boas idéias e compartilhado comigo sua experiência.

À Dr<sup>a</sup>. Rossana Melo pelo exemplo de competência e amor a pesquisa. Por ter aberto meus caminhos nesta jornada e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Hugo Caire Castro-Faria-Neto, por ter me recebido no seu laboratório com carinho e disposição para ajudar sempre.

À Dr<sup>a</sup>. Clarissa Maya-Monteiro por nunca ter me dado as respostas prontas, mesmo que eu implorasse, e sim o caminho para encontrá-las. Obrigada pelo incentivo nesta difícil jornada.

Às Dr<sup>as</sup>. Cecília Almeida e Adriana Vallochi pelas discussões e idéias sempre oportunas.

À Dr<sup>a</sup>. Luciana Moreira pela ajuda na realização dos experimentos, mas principalmente por ser essa referência de entusiasmo pela pesquisa. A melhor “compí” que eu poderia ter!

Ao Dr Rubem Menna-Barreto pelas discussões dos resultados ao longo do projeto e pela esmerada correção da tese.

Ao Prof. Dr Eugênio Hottz pelas ajudas com os experimentos, pelas boas idéias, mas principalmente pelo exemplo de determinação.

À Rose e ao Edson pelo exemplo de dinamismo e competência. Por todo o suporte durante o desenvolvimento do trabalho, mas principalmente pelo carinho e amizade.

Ao Dr Cassiano Albuquerque e Ana Paula Monteiro por me auxiliar nos experimentos *in vivo*. Ao doutorando Thiago Silva pelo suporte nas análises ultraestruturais. A ajuda de vocês foi fundamental!

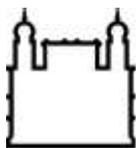
Às amigas, Ester Barreto, Sally Liechoki, Juliana Lopes e Natália Roque por dividir comigo minhas ansiedades e estarem sempre dispostas a me socorrer quando preciso. A hora do café com vocês sempre torna meus dias mais alegres.

Agradeço a todos do laboratório de Imunofarmacologia, em especial a Gisele Barbosa, Narayana Fazolini, Gláucia Almeida, Alan Brito, Andrea Surrage, Lohanna Palhinha, Jéssica Pereira, Vinícius Guerra, Lígia Paiva e todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho e por serem muitos não conseguirei listar neste pequeno espaço.

Aos integrantes do laboratório de biologia celular da UFJF, em especial às Dr<sup>as</sup> Patrícia Almeida e Heloísa D'ávila, e aos doutorandos Lívia Andressa, Kennedy Bonjour, Vítor Zarantonello, Juliana Gamalier pelo apoio e incentivo.

Estendo meus agradecimentos a todos os funcionários do biotério HPP, das secretárias do departamento e da pós-graduação pela ajuda sempre que necessário.

Aos órgãos de apoio à pesquisa CNPq e Capes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

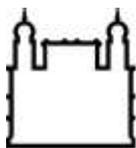
### **Papel das espécies reativas de oxigênio na biogênese de corpúsculos lipídicos e alterações oxidativas de seus componentes durante a sepse experimental**

#### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**Lívia Teixeira**

Sepse é a resposta inflamatória sistêmica secundária a um processo infeccioso e caracteriza-se por um desbalanço entre as respostas pró e antiinflamatórias. Em anos recentes tornou-se evidente que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial desempenham papéis importantes na falência de múltiplos órgãos associada à sepse. Além disso, alterações no metabolismo lipídico, com aumento na formação de corpúsculos lipídicos (CLs) tem sido demonstradas em modelos experimentais de sepse e também em amostras de pacientes sépticos. No entanto, pouco se sabe sobre a associação entre estes dois eventos na sepse, a saber, a produção de ROS e a biogênese de CLs e qual o impacto do estresse oxidativo sobre estas organelas. No presente trabalho demonstrou-se que o tratamento com antioxidante específico para ROS de origem mitocondrial bem como a inibição, farmacológica ou genética, da NADPH oxidase é capaz de reduzir significativamente a biogênese de CLs, indicando um papel importante de ROS, produzido por ambas as vias, nos mecanismos de formação destas organelas induzidas pelo estímulo com LPS + IFN $\gamma$ . Demonstramos também que os componentes lipídicos dos CLs são alvos da ação de ROS e sofrem peroxidação. Estes lipídios peroxidados induzem modificações proteicas principalmente em proteínas localizadas na periferia dos CLs fato este observado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. As alterações dos componentes moleculares dos CLs foram dependentes da ativação da NADPH oxidase uma vez que o pré tratamento com apocinina reduz a peroxidação lipídica e previne a modificação proteica induzidas por lipídios peroxidados *in vitro*. A interação entre CLs e mitocôndrias foram frequentes em nossos modelos. Alterações ultraestruturais nas mitocôndrias foram observadas principalmente naquelas que estabeleciam associação com os CLs em células peritoniais de animais submetidos ao CLP. No fígado, a sepse experimental induziu um aumento acentuado de CLs e em paralelo com alterações ultraestruturais de elétrons-densidade ao longo do tempo que apontam para mudanças na composição lipídica destas organelas. Tanto o acúmulo de CLs quanto alterações do metabolismo hepático estão correlacionados com a gravidade do modelo de sepse. Em conjunto estes resultados demonstram uma associação entre o estresse oxidativo, biogênese de CLs e alterações oxidativas de seus componentes, e sugerem que este mecanismo possa contribuir para o dano tecidual durante a sepse.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Role of reactive oxygen species on lipid droplets biogenesis and oxidative alterations of its components during experimental sepsis

#### ABSTRACT

#### TESE DE DOUTORADO

Lívia Teixeira de Almeida

Sepsis is a systemic inflammatory response secondary to an infectious process and is characterized by an imbalance between pro- and anti-inflammatory responses. In recent years it has become evident that oxidative stress and mitochondrial dysfunction play important roles in multiple organ failure associated with sepsis. In addition, changes in lipid metabolism with increased formation of lipid bodies (LBs) have been demonstrated in experimental models of sepsis also in septic patient samples. However, little is known about the association between these two events in sepsis, namely the production of ROS and the biogenesis of LBs and the impact of oxidative stress on these organelles. Our results showed that treatment with mitochondrial target antioxidant or pharmacological and genetic inhibition of NADPH oxidase is able to significantly reduce LBs biogenesis, indicating that ROS produced by both pathway play a role in mechanisms of formation of LB induced by LPS + IFN $\gamma$  stimuli. This work also showed that the lipid components of the LDs are targets of ROS action and is susceptible to peroxidation. These peroxidized lipids induced LDs proteins modifications mainly those located on its surface, fact observed both *in vitro* and *in vivo*. These LBs changes proved to be dependent on NADPH oxidase activation since pretreatment with apocynin reduces lipid peroxidation and prevents protein modification induced by peroxidized lipids *in vitro*. Close association between LBs and mitochondria was often observed in our experimental models. Ultrastructural changes in mitochondria were observed especially when they were interacting with LBs in peritoneal cells of animals submitted to CLP. In the liver, experimental sepsis induced a massive increase of LBs and over time ultrastructural changes of electron density that point to changes in lipid composition of these organelles. Both LBs accumulation and changes in hepatic metabolism are correlated with severity of sepsis model. All together these results demonstrate an association between oxidative stress, biogenesis of LBs and oxidative changes of its components, and suggest that mechanism may contribute to tissue injury during sepsis.

## Sumário

1	Introdução.....	1
1.1	Sepse.....	1
1.1.2	Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos ( <i>MODS</i> ) .....	2
1.1.3	Patogênese da sepse .....	3
1.1.4	Espécies reativas de oxigênio e a sepse .....	5
1.1.5	Dano oxidativo: peroxidação lipídica.....	12
1.1.6	Alterações do metabolismo lipídico na sepse .....	15
1.2	Corpúsculos lipídicos (CLs).....	17
1.2.1	CLs e a inflamação. ....	20
1.2.2	CLs e a lipotoxicidade.....	22
2	Justificativa .....	25
3	Objetivos.....	26
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos específicos .....	26
4	Material e Métodos .....	27
4.1	Animais .....	27
4.2	Ligadura e punção cecal (CLP).....	27
4.3	Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea.....	28
4.4	Obtenção de macrófagos p22 <sup>phox<sup>-/-</sup></sup> por CRISPR-Cas9 .....	28
4.5	Experimentos <i>in vitro</i> : estímulos e pré-tratamentos.....	29
4.6	Coloração e contagem de CLs: .....	30
4.7	Imunofluorescência (ADRP).....	31
4.8	Marcação de Mitocôndrias: .....	31
4.9	Avaliação de ROS total: .....	32
4.10	Avaliação de ROS mitocondrial:.....	32
4.11	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial: .....	32
4.12	Avaliação da peroxidação de lipídios .....	33

4.13	Avaliação da peroxidação de proteínas dos CLs: .....	33
4.14	Isolamento de CLs: .....	34
4.15	Dosagem de lactato .....	34
4.16	Dosagem de 8-Isoprostano (Ensaio Imuno enzimático – EIA) .....	34
4.17	Western blotting .....	35
4.18	Microscopia eletrônica .....	36
4.19	Análises por microscopia confocal: .....	36
4.20	Análises por citometria de fluxo: .....	36
4.21	Análises estatísticas: .....	36
5	Resultados: .....	37
5.1	Estímulo com LPS + IFN $\gamma$ induz aumento na produção de ROS e a biogênese de CLs .....	37
5.2	Disfunção mitocondrial é capaz de induzir a biogênese de CLs .....	40
5.3	Macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$ ou antimicina A, <i>in vitro</i> , apresentam aumento na expressão de proteína estrutural dos CLs. ....	43
5.4	A biogênese de CLs induzido por LPS + IFN $\gamma$ é dependente de ROS de origem mitocondrial .....	45
5.5	A biogênese de CLs induzido por LPS + IFN $\gamma$ é dependente da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase .....	46
5.6	CLs e mitocôndrias se encontram intimamente associados em macrófagos de medula estimulados com LPS+IFN $\gamma$ ou tratados com antimicina A. ....	50
5.7	ROS induz a peroxidação de lipídios presentes nos CLs de maneira dependente da ativação de NADPH oxidase .....	52
5.8	ROS induz a modificação de proteínas presentes nos CLs de maneira dependente da ativação de NADPH oxidase .....	58
5.9	Biogênese de CLs e modificações de seu conteúdo protéico mediada por lipídios peroxidados ocorrem em células do peritônio durante a sepse experimental <i>in vivo</i> .....	61
5.10	CLP induz alterações ultraestruturais nas mitocôndrias principalmente quando estas se encontram associadas aos CLs .....	65

5.11	Sepse induz a biogênese e alterações ultraestruturais dos CLs em paralelo com danos no tecido hepático .....	68
6	Discussão: .....	73
7	Conclusão:.....	93
8	Referências:.....	94

## LISTA DE FIGURA

<b>Figura 1:</b> Origem multifatorial do dano tecidual e disfunção orgânica na sepse.). ....	4
<b>Figura 2:</b> Formação de espécies reativas a partir do oxigênio.....	6
<b>Figura 3:</b> Família NADPH oxidase.....	8
<b>Figura 4:</b> Organização ultraestrutural dos CLs.. .....	18
<b>Figura 5:</b> Dinâmica de produção de ROS total e da formação de CLs em macrófagos estimulados com LPS+IFN $\gamma$ .....	38
<b>Figura 6:</b> Dinâmica de produção de ROS mitocondrial em macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$ .....	39
<b>Figura 7:</b> Dinâmica de produção de ROS total e da formação de CLs em macrófagos tratados com antimicina A.....	41
<b>Figura 8:</b> Dinâmica de produção de ROS mitocondrial em macrófagos tratados com antimicina A.. .....	42
<b>Figura 9:</b> Expressão de ADRP em macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$ ou tratados com drogas que atuam em diferentes componentes mitocondriais.. .....	44
<b>Figura 10:</b> Diminuição do número de CLs induzidos por LPS + IFN $\gamma$ após pré-tratamento com Mito-TEMPO.....	45
<b>Figura 11:</b> Efeito do pré-tratamento com apocinina sobre a biogênese de CLs induzida pelos estímulos com LPS + IFN $\gamma$ , <i>E. coli</i> e antimicina A.. .....	48
<b>Figura 12:</b> Produção de ROS, NO e biogênese de CLs em clones p22 <sup>phox<math>^{-/-}</math></sup> após estímulo com LPS + IFN $\gamma$ . .....	49
<b>Figura 13:</b> CLs e mitocôndrias estão intimamente associados em macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$ ou tratados com antimicina A. ....	51
<b>Figura 14:</b> Avaliação da peroxidação lipídica induzida pelo estímulo com LPS + IFN $\gamma$ ou tratamento com antimicina A. ....	53
<b>Figura 15:</b> Avaliação do efeito do pré-tratamento com Apocinina sobre a peroxidação lipídica induzida por LPS + IFN $\gamma$ .....	54
<b>Figura 16:</b> Avaliação do efeito do pré-tratamento com apocinina sobre a peroxidação lipídica induzida por LPS + IFN $\gamma$ . ....	55
<b>Figura 17:</b> Dosagem de 8-isoprostano no sobrenadante ou purificado de CLs de cultura de macrófagos estimuladas por LPS + IFN $\gamma$ ou tratadas com antimicina A ..	57
<b>Figura 18:</b> Detecção de proteínas modificadas pela peroxidação lipídica em macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$ ou tratados com antimicina A. ....	59

<b>Figura 19:</b> Detecção de proteínas modificadas pela peroxidação lipídica em macrófagos pré-tratados com apocinina e estimulados com LPS + IFN $\gamma$ (24h).....	60
<b>Figura 20:</b> Avaliação ultraestrutural de CLs em células do lavado peritoneal de camundongos Swiss 48h após o CLP.....	62
<b>Figura 21:</b> Detecção de proteínas modificadas pela peroxidação lipídica e dosagem de 8-isoprostano <i>in vivo</i> ..	64
<b>Figura 22:</b> Análise ultraestrutural de mitocôndrias em células do lavado peritoneal de camundongos Swiss 48h após o CLP.....	66
<b>Figura 23:</b> Avaliação da interação entre CLs e mitocôndrias (íntegras e alteradas) em células do lavado peritoneal de camundongos Swiss 48h após o CLP. ....	67
<b>Figura 24:</b> Avaliação quantitativa e morfométrica de CLs no tecido hepático de camundongos submetidos ao CLP.....	69
<b>Figura 25:</b> Avaliação da elétron-densidade dos CLs induzidos pela sepse experimental no fígado de camundongos Swiss..	70
<b>Figura 26:</b> Avaliação da formação de CLs e função hepática após a indução de sepse experimental com diferentes níveis de gravidade. ....	72
<b>Figura 27:</b> Representação esquemática das alterações na biologia dos CLs e consequente dano celular mediados por ROS na sepse.....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS:

15-LO – 15-lipoxigenase;

4-HNE – 4-hidroxinonenal

5-LO – 5-lipoxigenase;

ADRP – proteína relacionada à diferenciação de adipócito

Apo A-I – apolipoproteína A-I

ARDS– síndrome do estresse respiratório agudo

ARF – fator de ribosilação de ADP

ATGL – lipase adiposa de triacilglicerídeos

ATP – trifosfato de adenosina

BCG – micobactéria *Bacillus Calmette-Guérin*

bFGF – fator de crescimento de fibroblastos básico

CAT – catalaseas

CCL11 – eotaxina (do inglês, *C-C motif chemokine 11*),

CCL5 – (do inglês, *chemokine (C-C motif) ligand 5*)

CCR3 – do inglês, *C-C chemokine receptor type 3*

CD11b – do inglês, *cluster of differentiation 11b*

CD14 – do inglês *cluster of differentiation 14*

CL – corpúsculos lipídicos

CLP – ligadura e punção cecal

CoQ – coenzima Q10

CPT-1 – carnitina palmitoiltransferase-1

DAG – diacilglicerol

DAMPS – padrão molecular associado ao dano

Dgat1 – acil-CoA:diacilglicerolaciltransferase

DHE – diidroergotamina

DMSO – dimetilsulfóxido

CTE – cadeia transportadora de elétrons

G6PD – enzima glicose-6-fosfato desidrogenase

GFP – proteína verde fluorescente

GPx – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GRX – glutathione reductase

GSSG – glutathione oxidada

HBSS – Solução Balanceada de Hank's

HDL – lipoproteína de alta densidade

IFN $\gamma$  – interferon gama

IL – interleucina

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LPS – lipopolissacarídeo

LTC $_4$  – leucotrieno C $_4$

MCAD – acil-CoA desidrogenase de cadeia média

MCP-1 – proteína quimioatrativa de monócitos

MDA – malondialdeído

MODS – síndrome da disfunção de múltiplos órgãos

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NO – óxido nítrico

ORO – *oil red o*

PAF – fator ativador de plaquetas

PAMPs– padrão moleculares associados a patógenos

PBS – tampão fosfato-salino

PGC-1 $\alpha$  – co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>

PLA<sub>2</sub> – fosfolipase A<sub>2</sub>

PLIN 1 – perilipina 1

PLIN 2 – perilipina 2 ( ou ADRP)

PLIN 3 – perilipina 3 (ou TIP-47)

PPAR $\alpha$  – receptor ativado por proliferador de peroxissomo alfa

PRRs – receptores de reconhecimento padrão

PRXs – peroxiredoxinas

PTEN – homólogo de fosfatase e tensina

PUFAs – ácidos graxos poli-insaturados

RANTES – CCL5

RE – retículo endoplasmático

rHDL – lipoproteína de alta densidade reconstituído

ROS – espécies reativas de oxigênio

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SOD – superóxido dismutase

TAG – Triacilgliceróis

TBARS – substância reativas ao ácido tiobarbitúrico

TIP47 – do inglês, *tail-interacting protein of 47kDa*

TLR – receptores do tipo Toll

TMRE – tetrametilrodamina

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral

Trx – tioredoxina

# 1 Introdução

## 1.1 Sepses

Sepses é definida como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) secundária a um processo infeccioso com a presença de algum grau de disfunção orgânica (Vincent et al., 2013). Trata-se de uma síndrome complexa onde as respostas pró e antiinflamatórias coexistem e, de maneira desregulada, causam danos aos tecidos e órgãos do paciente (Cohen et al., 2015). Estudos europeus e norte-americanos apontam para uma incidência de 200-1000 casos por cada 100.000 habitantes (Angus et al., 2001; Flaatten, 2004; Wilhelms et al., 2010). Apenas nos Estados Unidos a sepses é responsável por 200.000 mortes anuais (Angus et al., 2001). Apesar dos avanços em terapia intensiva moderna, a taxa de mortalidade global causada pela sepses grave é superior a 30% e alcançam até 50% quando o choque está presente (Vincent et al., 2014), sendo a terceira causa principal de morte depois das doenças cardiovasculares e câncer. Estima-se que \$16.7 bilhões de dólares sejam gastos anualmente no tratamento dos pacientes nos Estados Unidos (Angus and Wax, 2001). O aumento da incidência de sepses está relacionado ao aumento do uso de antibióticos de amplo espectro mais potentes, agentes imunossupressores, e técnicas invasivas no tratamento de doenças inflamatórias, infecciosas e neoplásicas (Bone, 1992).

Não existe atualmente um tratamento específico efetivo para septicemia, e talvez a grande dificuldade em desenvolvê-lo esteja na complexidade desta síndrome. A sepses consiste em um conjunto heterogêneo de infecções que variam quanto ao agente causador e foco infeccioso além de ter seu curso altamente influenciado pelo *status* imunológico do paciente. A gestão dos pacientes com sepses baseia-se principalmente no reconhecimento precoce do quadro e a rápida administração de antibióticos adequados e medidas de controle da origem da infecção, sendo a administração de fluidos intravenosos e drogas vasoativas indicado nos casos mais graves (Dellinger et al., 2013). Os sintomas observados incluem, mas não se limitam, a temperatura corpórea maior que 38°C ou menor que 36°C; frequência cardíaca maior que 90 batidas/minuto; taquipnéia (taxa respiratória maior que 20 inspiros/minuto) ou hiperventilação ( PaCO<sub>2</sub> menor que 32 mm Hg); e alterações nas contagens de leucócitos (maior que 12.000/cu mm ou menor que

4.000/cu mm, ou a presença de mais de 10% de neutrófilos imaturos) (Bone et al., 1992).

A utilização dos critérios de SIRS para a definição dos sintomas da sepse tem sido questionada uma vez que dentro destes critérios estão abarcadas as infecções estéreis, como pancreatites, traumas e doenças auto imunes, e as infecções de menor gravidade tão recorrentes no ambiente de unidades de terapia intensiva. Uma definição mais direcionada e sensível em detectar os casos onde a inflamação sistêmica causada por um quadro infeccioso tende a evoluir para a sepse é de extrema importância para uma intervenção precoce apropriada. A proposta atual defende a avaliação de sinais de danos teciduais e disfunção orgânica. A avaliação sistemática da função cardiovascular, respiratória, renal, neurológica, hepática, e de coagulação do paciente permite detectar qualquer tipo de disfunção orgânica associada que possa indicar uma doença aguda com potencial risco de morte, que tem de ser tratada rapidamente e de forma adequada para evitar o desenvolvimento de falência de múltiplos órgãos e otimizar os resultados clínicos (Dellinger et al., 2013).

### 1.1.2 **Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS)**

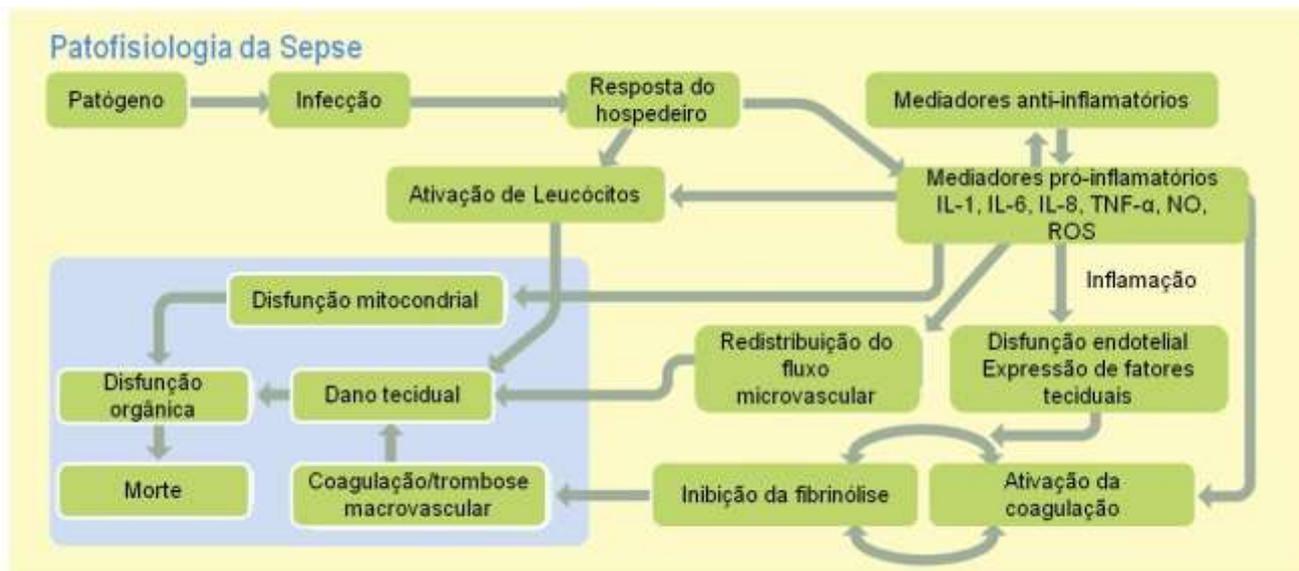
Uma vez desencadeada, a resposta imune exacerbada característica do quadro séptico pode progredir para diferentes estágios de gravidade. No que tange a classificação, a sepse grave pode ser associada com hipoperfusão, hipotensão e disfunção orgânica aguda. O choque séptico é definido como o quadro séptico onde há hipotensão mesmo com a adequada administração de fluidos de ressuscitação (Vincent et al., 2013). Dado que SIRS/sepse é um processo contínuo, a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (*do inglês MODS*) pode ser entendida como representando o final mais severo do espectro de gravidade da doença. A MODS pode ser definida como “o desenvolvimento de um desarranjo fisiológico potencialmente reversível de dois ou mais sistemas orgânicos que não se relaciona com a desordem que levou a internação inicial na UTI elevando o risco de morte” (Ramírez, 2013).

A disfunção orgânica aguda afeta de maneira mais frequente os sistemas respiratório e cardiovascular. O comprometimento respiratório geralmente se manifesta como a síndrome do estresse respiratório agudo (*do inglês ARDS*) caracterizado pela hipoxemia e infiltrado de origem não-cardíaca (Ranieri et al., 2012a). Já o comprometimento cardiovascular inclui o aumento de lactato

circulante, como consequência da hipóxia, e a hipotensão (Dellinger et al., 2013). O sistema nervoso central e os rins também são frequentemente afetados, sendo a disfunção do sistema nervoso central caracterizada por lesões de encefalopatia não focal e apresenta manifestações clínicas que incluem obnubilação e delírio. Por sua vez, a disfunção renal é reconhecida pela diminuição da produção de urina e aumento nos níveis de creatinina no soro, o que frequentemente exige a terapia de hemodiálise. Outras alterações recorrentes entre pacientes com sepse grave incluem íleo paralítico, níveis de aminotransferase elevados, alteração no controle glicêmico, trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada, disfunção adrenal e síndrome eutireoideana (Levy et al., 2003). Existe uma forte associação entre o número de sistemas orgânicos disfuncionais e o prognóstico do paciente. O risco de morte eleva proporcionalmente ao número de órgãos disfuncionais podendo chegar a 90% em pacientes com quatro ou mais sistemas orgânicos em falência (Shapiro et al., 2006). De fato, a principal causa de morte entre os pacientes sépticos é a falência de órgãos vitais (Deitch, 1992).

### 1.1.3 Patogênese da sepse

Os mecanismos envolvidos no choque e lesões de órgãos induzidos pela sepse são multifatoriais (Figura 1). Envolve a ativação massiva de sistemas celulares importantes como o sistema monócitos-macrófagos, polimorfonucleares e células endoteliais. Este processo de ativação leva à síntese e liberação de produtos celulares como citocinas, proteases, eicosanóides, fator ativador de plaquetas e espécies reativas de oxigênio (ROS), que em conjunto contribuem para o dano tecidual e falência orgânica (Salvemini e Cuzzocrea, 2002; Stearns-Kurosawa et al., 2011). No caso da sepse, a ativação desordenada da resposta inflamatória é consequência de um foco infeccioso (Parrillo et al., 1990). As infecções bacterianas, principalmente as causadas por bactérias Gram-negativas, respondem por aproximadamente 50% dos casos que evoluem para o quadro séptico (Alberti et al., 2002). *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* e *Pseudomonas aeruginosa* são as bactérias Gram-negativas predominantes nas culturas isoladas de pacientes sépticos enquanto *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* são as principais bactérias Gram-positivas (Opal et al., 2003; Ranieri et al., 2012b).



**Figura 1: Origem multifatorial do dano tecidual e disfunção orgânica na sepses.**  
Adaptado (Gupta e Jonas, 2006).

Os microorganismos podem liberar moléculas durante o processo de invasão do hospedeiro e ao longo do processo infeccioso. Estas moléculas conhecidas como PAMPs (do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) são reconhecidas pelo sistema imune inato do hospedeiro como moléculas não próprias, e a partir de suas estruturas moleculares as identificam como sendo de origem microbiana (Janeway e Medzhitov, 2002). A ativação da resposta inflamatória e imune na sepses é mediada pelos PRRs (do inglês *patterns recognition receptors*) dentre os quais os receptores do tipo Toll (TLRs) são os mais estudados. Até o momento a família dos TLRs é composta por dez membros que reconhecem os componentes presentes em diversos patógenos incluindo bactérias, fungos e vírus (Aderem e Ulevitch, 2000). Apesar de haver a possibilidade de um mesmo receptor reconhecer diferentes PAMPs, o TLR2 reconhece principalmente componentes da parede de bactérias Gram-positivas. O TLR4 é responsável por reconhecer lipopolissacarídeos (LPS), componente da parede de bactérias Gram-negativas, e provavelmente o PAMP mais amplamente reconhecido no contexto da sepses. TLR5 reconhece flagelina e o TLR9 motivos CpG presentes nos ácidos nucleicos bacterianos (Bauer et al., 2001; Hayashi et al., 2001; Takeuchi et al., 1999).

TLRs são glicoproteínas, e sua porção extracelular consiste em domínios com repetições ricas em leucinas responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs. O domínio transmembrana e intracelular é conhecido com TIR (Toll-IL-1R) nomeado assim pela sua extensa homologia com o receptor de interleucina 1 (IL-1). A ativação dos TLR por seu ligante provoca mudanças conformacionais na porção

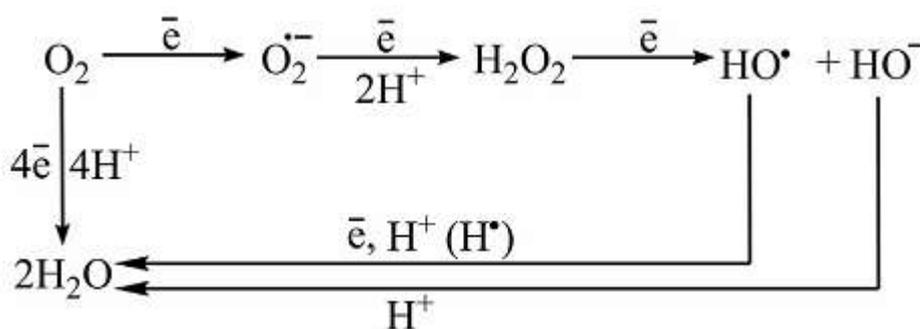
intracelular permitindo a associação de proteínas adaptadoras, que por sua vez ancoram e ativam a proteína cinase associada ao receptor de IL-1. Uma vez ativada, esta enzima é responsável pela indução do fator associado ao receptor de TNF 6 (TRAF 6) e provoca a translocação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), responsável por modular a expressão de vários genes envolvidos na resposta inflamatória, incluindo os genes de citocinas (Cinel e Opal, 2009). Macrófagos ativados via TLR4, por exemplo, após 60-90 minutos do estímulo produzem uma ampla gama de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12. Trabalhos experimentais e clínicos destacam o papel dos TLRs no desenvolvimento da sepse, principalmente TLR2 e TLR4, e o bloqueio de TLR4 tem sido avaliado como possível tratamento de pacientes com sepse grave (Barochia et al., 2011; Paterson et al., 2003; Wittebole et al., 2010).

Além disto, o dano tecidual causado pela reação inflamatória desordenada durante a sepse contribui para a amplificação da resposta imune. Moléculas endógenas liberadas na circulação como consequência da lesão tecidual são capazes de ativar vias de sinalização inflamatórias. Estas moléculas são conhecidas como padrão molecular associado ao dano ou DAMPs e podem incluir DNA livre, histonas, proteínas do choque térmico e componentes mitocondriais (Abraham e Singer, 2007; Zhang et al., 2010). Durante a sepse, o aumento na secreção de citocinas mediado pelo reconhecimento de PAMPs e DAMPs promove a ativação de diferentes vias de sinalização intracelular, entre elas vias responsáveis pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Alguns dos mecanismos moleculares postulados para progressão da sepse estão ligados ao desequilíbrio entre a produção de ROS e sua degradação por antioxidantes celulares (Andrades et al., 2009). Estudos clínicos tem demonstrado a associação entre o aumento na produção de ROS, o desenvolvimento de disfunção orgânica e o prognóstico do paciente (Ojeda et al., 2011; Santos et al., 2012).

#### 1.1.4 **Espécies reativas de oxigênio e a sepse**

O termo radicais livres refere-se a espécies químicas que apresentam elétrons não pareados na camada orbital mais externa (Riley, 1994). Foram descritos pela primeira vez por Moses Gomberg, e devido sua alta reatividade e meia vida curta, sua presença em sistemas biológicos foi inicialmente descartada (Gomberg, 1900). Em 1954, no entanto, esta visão mudou e sua associação com

processos patológicos e de envelhecimento foi quase imediato (Commoner et al., 1954). Em muitos textos os termos radicais livres e ROS são tratados como sinônimos. Entretanto ROS são representadas por moléculas necessariamente oxigenadas que podem ou não apresentar radicais livres. Como por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ânions superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), oxigênio atômico ( $1/2 \text{O}_2$ ), e radicais hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ). ROS são subprodutos do metabolismo aeróbico e, em condições normais durante a respiração celular, uma pequena quantidade do oxigênio consumido pelas células (menos de 10%) é reduzido à estas entidades químicas altamente reativas. (Figura 2). Cerca de 90% do ROS intracelular são produzidos nas mitocôndrias (Skulachev, 2012), na cadeia transportadora de elétrons (CTE). Os elétrons podem escapar da CTE, principalmente da coenzima Q, e se associar ao oxigênio molecular gerando o ânion superóxido, que serão convertidos espontaneamente ou enzimaticamente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou  $\text{HO}^{\cdot}$ .



**Figura 2: Formação de espécies reativas a partir do oxigênio.** O oxigênio molecular ao ganhar um elétron é reduzido a ânions superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Uma redução adicional acompanhada da ligação de duas moléculas de hidrogênio produz o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que apesar de ser uma mlécula altamente reativa não é considerada um radical livre. Ao receber mais um elétron é dissociado em um radical hidroxila e um ânion hidroxila, que ao se associarem respectivamente com um elétron e um próton, ou apenas um próton, produzem água ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Retirado de (Lushchak, 2014)

Existem outras fontes intracelulares de ROS que, em condições normais, contribuem em menor proporção. É o caso do retículo endoplasmático (principalmente a família de enzimas citocromo P450), os peroxissomos que são importantes organelas envolvidas na detoxificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Boveris et al., 1972), as membranas nucleares que contém citocromo oxidases e sistemas de transporte de elétrons de função ainda desconhecida (Freeman e Crapo, 1982) e a membrana plasmática cuja as enzimas oxidases associadas são responsáveis pela produção

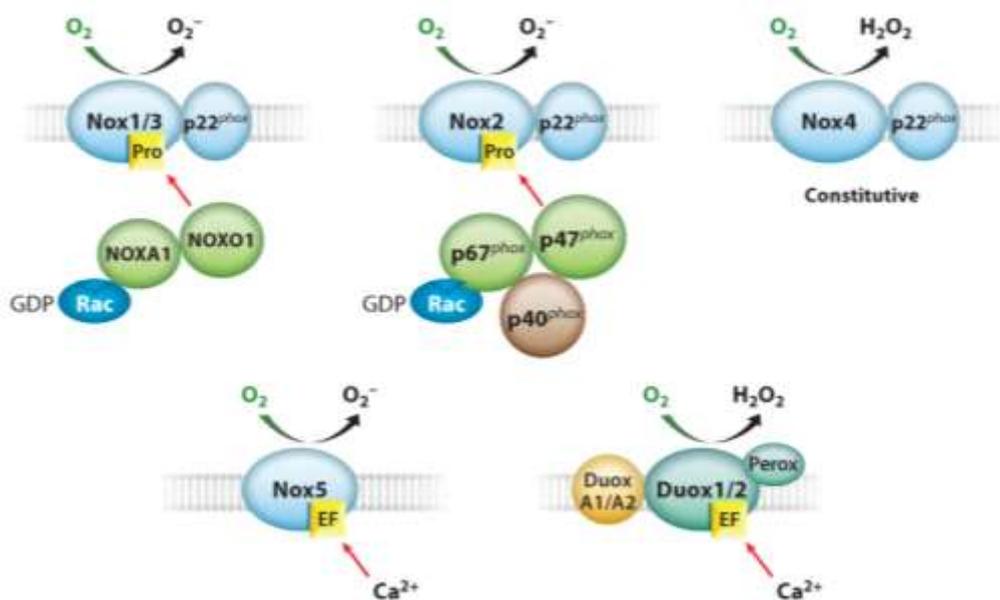
de oxidantes estimulados pela maioria dos fatores de crescimento e citocinas (Hordijk, 2006; Sundaresan et al., 1995).

As oxidases tem importante papel na geração de ROS durante a resposta inflamatória (Rada e Leto, 2008). Apesar de frequentemente se encontrarem associada à membrana algumas oxidases são encontradas na forma solúvel. Estas enzimas oxidam substratos orgânicos como carboidratos, aminoácidos, aldeídos, e em determinadas circunstâncias liberam uma quantidade significativa de ROS. Em situação de hipóxia, por exemplo, a enzima xantina oxidase pode ser a principal fonte de ROS (Griguer et al., 2006; Nanduri et al., 2013). Quando patógenos são reconhecidos pelo sistema imune o complexo enzimático da NADPH oxidase (NOX) é ativado e o ROS produzido é capaz de inativar e até mesmo eliminar o agente infeccioso (Briggs et al., 1977; Kakinuma et al., 1980).

Os membros da família NOX talvez sejam as oxidases melhor estudadas (Figura 4). Todos os membros da família NOX são proteínas transmembranas que transportam elétrons através de membranas celulares reduzindo o oxigênio molecular a íons superóxido. Para isso, seus membros compartilham homologies estruturais que incluem seis domínios transmembranas, um sítio de ligação ao NADPH (fonte dos elétrons usada na redução do oxigênio), um domínio contendo adenina flavina dinucleotídeo (FAD) e quatro grupos heme (por isso considerados flavocitocromos) (Bedard e Krause, 2007). O primeiro membro da família NOX foi descoberto inicialmente em fagócitos, como uma enzima central no processo de *burst* respiratório (nomeadas como gp91<sup>phox</sup> agora chamada de NOX2), cuja única função enzimática é produzir ROS, diferentes de outras fontes onde ROS é apenas um subproduto de outras reações (Brandes et al., 2014; Nayernia et al., 2014).

A NOX2 ao longo do tempo foi extensivamente estudada e seu funcionamento ajuda a compreender as outras isoformas da família. Em estado quiescente, NOX2 se associa constitutivamente com p22<sup>phox</sup> (formando o flavocitocromo b<sub>558</sub>), esta ligação é fundamental para a estabilidade de NOX2 na membrana, uma vez que células fagocíticas de pacientes deficientes em p22<sup>phox</sup> apresentam níveis não detectáveis de NOX2 (Dinauer et al., 1990; Parkos et al., 1989). Para sua ativação outras subunidades localizadas no citosol precisam ser recrutadas e associar ao dímero NOX2/p22<sup>phox</sup>, são elas as proteínas reguladoras, p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup> (Groemping and Rittinger, 2005; Sumimoto et al., 2005). Após estímulo a subunidade reguladora p47<sup>phox</sup> é fosforilada induzindo mudanças conformacionais que permitem sua associação a p22<sup>phox</sup> promovendo a translocação

do complexo citosólico inteiro para a membrana. Pequenas GTPases como a Rac2 GTPase e Rap1A também são requeridas para a montagem e ativação do complexo (Diebold e Bokoch, 2001). Uma vez ativado, o complexo produz íons superóxidos a partir da transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular. Nos últimos anos muitos avanços foram feitos nos estudos dos homólogos da NOX2. Atualmente, a família NOX é composta por sete membros nomeadas NOX 1-5 e DUOX1 e 2, compartilhando entre si extensa homologia e diferem quanto a distribuição entre os diversos tipos celulares, as subunidades estruturais, dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  e o tipo de ROS produzido (Panday et al., 2015) (Figura 3).



**Figura 3: Família NADPH oxidase.** Possui sete isoformas descritas, NOX 1-5 e DUOX 1 e 2, classificadas pela estrutura dos domínios, regulação e ROS gerado. NOX 1 e 3 formam heterodímeros com a proteína  $p22^{\text{phox}}$  e para formar o complexo ativo se associam com as proteínas citoplasmáticas RAC, NOXA1 e NOXO1. NOX 2 também está presente na membrana associada a  $p22^{\text{phox}}$  e sob ativação recruta os componentes citoplasmáticos RAC,  $p67^{\text{phox}}$ ,  $p47^{\text{phox}}$  e  $p40^{\text{phox}}$ . NOX 4 se associa a  $p22^{\text{phox}}$ , mas não depende de proteínas citoplasmáticas, além disso, é constitutivamente ativa. Nox 5 e Duox1 e DUOX2 são ativadas pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e estes dois últimos formam complexos com as proteínas transmembranares DUOXA1 e DUOXA2 respectivamente. NOX1, 2, 3 e 5 produzem primariamente íons superóxidos enquanto NOX 4 e DUOX1 e 2 geram principalmente peróxido de hidrogênio. Retirado de (Lambeth e Neish, 2014).

Organismos vivos possuem sistemas finamente regulados para manter baixos os níveis de ROS, isto é, a sua produção e eliminação são bem equilibrados

(Persson et al., 2014). As defesas antioxidantes tem importante papel nesta regulação e, para fins didáticos, podem ser divididas em duas categorias, os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Aslani e Ghobadi, 2016). Dentre os antioxidantes enzimáticos temos as enzimas primárias, chamadas assim porque previnem a formação de ROS ou neutralizam sua ação, como a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) as peroxiredoxinas (PRXs) e a superóxido dismutase (SOD), sendo as enzimas antioxidantes mais efetivas (Carocho e Ferreira, 2013; Jönsson et al., 2009; Rahman, 2007; Valko et al., 2006). As enzimas secundárias são aquelas que não neutralizam diretamente as espécies reativas, mas desempenham um papel fundamental auxiliando a atuação de outros antioxidantes, principalmente por regenerar o potencial redutor destes agentes. Como exemplo, podemos citar a glutathione reductase (GR) que reduz a glutathione oxidada (GSSG) e a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) que regenera o NADPH (Carocho e Ferreira, 2013).

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser classificados como antioxidantes metabólicos ou nutrientes antioxidantes. Antioxidantes metabólicos são gerados endogenamente por vias metabólicas específicas, incluem os antioxidantes que possuem o grupamento tiol como a glutathione, tioredoxina (Trx), glutaredoxina (GRX) e o ácido lipóico. Além destes, existem também a melatonina, coenzima Q10 (CoQ), ácido úrico, bilirrubina e as proteínas quelantes de metais (Nordberg e Arnér, 2001; Pham-Huy et al., 2008; Rahman, 2007). Como o próprio nome já diz, os nutrientes antioxidantes são aqueles obtidos de fontes exógenas através da alimentação ou pela ingestão de suplementos vitamínicos e minerais. Nesta categoria se encontram a vitamina C, vitamina E, carotenóides, selênio, enxofre, zinco e compostos polifenólicos (Battin e Brumaghim, 2009; Fang et al., 2002; Pham-Huy et al., 2008; Rahman, 2007).

O papel de ROS não se limita a efeitos deletérios, apesar desta ser a visão predominante por muito tempo, efeitos biológicos importantes vem sendo atribuídos às ROS (Schieber e Chandel, 2014). Por exemplo, seu papel na resposta imune vai além da ação citotóxica direta sobre os patógenos (Babior et al., 1975, 1973), evidências recentes mostram que ROS são importantes segundos mensageiros durante as respostas imunes inata e adaptativa (Kamiski et al., 2013; West et al., 2011). A participação da sinalização via ROS na ativação de fatores de crescimento, acompanhada pelo sua ação na inativação de fosfatases, como a supressora de tumores PTEN (do inglês *Phosphatase and tensin homolog*), evidencia seu papel

regulador sobre a proliferação celular (Kwon et al., 2004; Lee et al., 2002; Leslie et al., 2003). ROS é essencial também no processo de diferenciação de vários tipos celulares, incluindo a diferenciação de células tronco mesenquimais em adipócitos (Tormos et al., 2011) e de precursores hematopoiéticos (Juntilla et al., 2010). Hoje se sabe que os níveis de ROS podem ser controlados por hormônios como a insulina (Spagnoli et al., 1995) reforçando a possibilidade do seu envolvimento em processos metabólicos.

Chamamos de estresse oxidativo a produção excessiva de ROS que não pode ser contrabalanceada pelas defesas antioxidantes, perturbando assim o balanço redox da célula (Sies, 1985). Devido a sua instabilidade molecular, o ROS em excesso reage prontamente com biomoléculas alterando sua estrutura e função. O estresse oxidativo está associado a inúmeras patologias, além de ter funções definidas no processo de envelhecimento (Berlett e Stadtman, 1997; Halliwell et al., 1992; Uttara et al., 2009). Em um organismo, as duas fontes mais potentes de espécies reativas são a disfunção mitocondrial e o sistema imune ativado, ambos os eventos ocorrem na sepse (Blackwell e Christman, 1997).

Devido a correlação observada entre o aumento do lactato circulante (metabolismo anaeróbio) e a taxa de mortalidade de pacientes (Border e Weil, 1964), inicialmente acreditava-se que disfunção orgânica ocorria principalmente em consequência de alterações na perfusão e a consequente hipóxia tecidual. Entretanto, medidas para otimizar a perfusão tecidual tem mostrados ter pouco ou nenhum benefício no quadro de sepse associada a disfunção de um ou mais órgãos (Hayes et al 1994; Gattinoni et al. 1995). Além disto, trabalhos tem demonstrado que durante a sepse ocorre uma redistribuição do fluxo microvascular (Ince et al, 1999) e também uma normal, ou mesmo aumentada, tensão do oxigênio em órgãos de animais e pacientes com sepse (VanderMeer et.al 1995; Rosser et al, 1995; Boekstegers et. al,1991; Sair et.al, 2001) sugerindo que o defeito resida mais na inabilidade das células em usar o oxigênio (disoxia) do que na distribuição de oxigênio *per se*.

A hipótese da hipóxia citopática proposta por Fink postula que um desarranjo intrínseco do metabolismo energético da célula com dano à fosforilação oxidativa e redução na produção de ATP potencialmente induz a *MODS* (Fink, 2002). Está bem descrito na literatura que a disfunção mitocondrial está envolvida na patogênese da *MODS* em várias condições patológicas (Brealey e Singer, 2003; Hotchkiss e Karl, 2003; Streck et al., 2003; Wallace, 2005). Na sepse, tanto em modelos

experimentais quanto em humanos as mitocôndrias manifestam evidências de danos a nível ultraestrutural e anormalidades bioenergéticas que correlacionam com a gravidade do quadro (Krishnagopalan et al, 2002; Crouser et al, 2002; Brealey et al, 2002).

Os mecanismos associados à disfunção mitocondrial durante a sepse derivam de uma série de eventos complexos. A combinação da produção de grandes quantidades de ROS, NO e mediadores inflamatórios podem influenciar diretamente na função mitocondrial e na produção de energia. Por exemplo, a peroxidação do lipídio cardiolipina, presentes na membrana mitocondrial interna, induz modificações profundas na fisiologia da membrana que levam a dissociação do citocromo c, redução da produção de ATP e ainda mais produção de ROS (Dröge, 2002; James e Murphy, 2002). Além disso, o DNA mitocondrial (DNAMt) também é um alvo para os danos gerados pelo estresse oxidativo, ainda mais devido à sua proximidade à CTE. O DNAMt codifica genes para vários polipeptídeos vitais para o transporte de elétrons e a geração de energia. O dano oxidativo ao DNAMt pode acarretar na produção de proteínas defeituosas e perda de função das enzimas envolvidas no transporte de elétrons e mais geração de ROS (Fariss et al., 2005; Remmen e Richardson, 2001). Entretanto, a ocorrência destes ciclos de auto-amplificação da geração de ROS e danos mitocondriais ainda não se encontram claros no caso da sepse.

Além da disfunção mitocondrial, na sepse, existem várias fontes potenciais de ROS. A ativação da xantina oxidase, por exemplo, ocorre em resultado dos episódios de esquia e reperfusão e refletem a perda de controle da microvasculatura. Pacientes sépticos apresentam níveis aumentados de atividade da xantina oxidase (Galley et al., 1996), e seus níveis são superiores em pacientes que não sobreviveram a sepse em comparação com os sobreviventes (Luchtemberg et al., 2008). Mas, a principal oxidase envolvida na produção de ROS durante a sepse é a NADPH oxidase e sua ativação responde pela principal fonte de  $O_2^{\cdot-}$  (Babior, 2004), essencial para o *burst* respiratório associado a ativação de leucócitos. Os ânions superóxido gerados pelo complexo da NADPH-oxidase em células fagocíticas tem função primordial na eliminação de microorganismos invasores e conseqüentemente no controle da infecção, uma vez que camundongos deficientes em subunidades da NADPH-oxidase e humanos com doença granulomatosa crônica, onde também falta a atividade da NADPH oxidase, são incapazes de executar adequadamente as funções bactericidas (Gao et al., 2002).

Os danos decorrentes do estresse oxidativo ocorrem quando há excesso na produção de ROS e/ou ineficiência nas defesas antioxidantes incluindo SOD, CAT, as vitaminas C e E, e GSH, e ambos processos podem ocorrer durante a sepse (Cowley et al., 1996a; Galley et al., 1997; Macdonald et al., 2003). Após a indução da sepse, trabalhos mostram que o desequilíbrio entre as enzimas antioxidantes SOD e CAT é seguida por danos oxidativos nos principais sistemas de órgãos (pulmão, coração, fígado, e rim) (Hotchkiss e Karl, 2003). Além disso, evidências sugerem que a capacidade antioxidante total do plasma de pacientes em estágios iniciais de disfunção orgânica se encontra reduzida (Cowley et al., 1996b). Pacientes sépticos apresentam redução nos níveis de alfa-tocoferol (Goode et al., 1995; Ogilvie et al., 1991), selenio (Ogilvie et al., 1991), vitamina A, beta-caroteno, licopeno (Goode et al., 1995) e ácido ascórbico (Borrelli et al., 1996). De maneira interessante, a concentração de ácido ascórbico (vitamina C) no plasma se correlaciona inversamente com a incidência de falência orgânica e diretamente com a taxa de sobrevivência (Borrelli et al., 1996). Por isso a terapia antioxidante tem sido considerada como um potencial tratamento para a *MODS* (Andrades et al., 2011; Crimi et al., 2006; Fowler et al., 2014).

#### 1.1.5 **Dano oxidativo: peroxidação lipídica.**

Devido ao papel de ROS no processo de eliminação de patógenos e sua participação como segundo mensageiro na transdução de sinal e na ativação de genes durante a resposta inflamatória sua importância na resposta imune do hospedeiro não pode ser desconsiderada. (Ray et al., 2012). Entretanto, na sepse, a produção desregulada de ROS associada a níveis inadequados de defesas antioxidantes levam a efeitos deletérios graves sobre a maquinaria celular e seus componentes (Galley, 2011; Víctor et al., 2009). Em altas concentrações, ROS pode causar dano a todos os tipos de biomoléculas presentes no organismo.

O dano oxidativo às proteínas, por exemplo, pode ser causado pela ação direta de ROS ou pela reações com intermediários reativos gerados pelo estresse oxidativo. Alterações estruturais importantes ocorrem como a quebra da estrutura proteica, *cross-linking* e modificações nas cadeias laterais de praticamente todos os aminoácidos, sendo a maioria destas modificações irreversíveis (Davies, 2005; Davies et al., 1999; Stadtman e Berlett, 1997). As proteínas participam ativamente na maioria dos processos biológicos celulares e por isso estas modificações tem

uma ampla gama de consequências funcionais como a inibição de atividade enzimática, alterações no funcionamento de receptores e proteínas carreadoras, formação de agregados, aumento da susceptibilidade à proteólise, dentre outros (Grune et al., 2003; Stadtman e Levine, 2003). Proteínas carboniladas são geradas pela oxidação de cadeias laterais de vários aminoácidos e por sua estabilidade química são importantes biomarcadores do dano oxidativo em diferentes condições, incluindo na sepse (Winterbourn et al., 2000).

O DNA também pode ser afetado pelo estresse oxidativo. Degradação de bases, fragmentação de fitas simples ou dupla, modificações nas estruturas de purinas, pirimidinas ou da pentose, *cross-linking* com proteínas são algumas das alterações observadas. Além disso, uma série de alterações na sequência de bases decorrentes de deleções ou translocações são geradas pelo dano oxidativo, mas de maneira indireta, pela inativação de enzimas de reparo do DNA e danos a DNA polimerase (Halliwell e Gutteridge, 2007). Normalmente, o 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8 OHdG) é medido como um índice de dano oxidativo ao DNA (Halliwell e Whiteman, 2004).

Dentre as biomoléculas mais susceptíveis ao dano oxidativo podemos destacar os lipídios. Atualmente a peroxidação lipídica é considerada o principal mecanismo molecular envolvido no dano oxidativo às estruturas celulares e em processos de toxicidade que levam à morte celular. Pode ser descrito de maneira geral como um processo em que oxidantes, tais como os radicais livres, atacam os lipídios contendo uma ligação dupla carbono-carbono. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são mais susceptíveis ao ataque por radicais livres, devido à presença de carbono metilênico *bis*-alílico. A ligação metileno C-H próxima a uma dupla ligação é enfraquecida e como consequência o hidrogênio é mais propenso à abstração. O elétron não pareado é estabilizado por um rearranjo molecular das duplas ligações formando dienos conjugados que combinados ao oxigênio formam o radical peroxil (ou peroxila), esta reação pode ser chamada de iniciadora. A partir daí a reação oxidativa pode ser amplificada uma vez que os radicais lipídicos peroxil podem subtrair átomos de hidrogênios de outros PUFAs iniciando uma reação em cadeia (Halliwell e Gutteridge, 1984; Yin et al., 2011).

A decomposição de peróxidos lipídicos é catalisada pelos complexos de metais de transição e produzem intermediários reativos como os radicais alcóxila ( $RO\cdot$ ), hidroxila ( $HO\cdot$ ) e alquila, que assim como o radical peroxil, são capazes de retirar átomos de hidrogênio dos PUFAs, perpetuando a reação de peroxidação

lipídica. Este ciclo de produção de radicais peroxil gerando hidroperóxidos orgânicos é chamado de fase de propagação e explica a conversão de vários PUFAs em hidroperóxidos lipídicos a partir de uma reação de iniciação. Após rearranjo, os produtos finais da peroxidação lipídica se tornam relativamente estáveis, são compostos principalmente por aldeídos reativos  $\alpha,\beta$ -insaturados, como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), e 2-propenal (acroleína), e os isoprostanos (Esterbauer et al., 1991).

Devido sua natureza anfifílica, estes aldeídos reativos podem se difundir facilmente através da membrana e atuar em sítios intracelulares distintos ou mesmo fora da célula, atuando como segundos mensageiros de eventos citotóxicos em regiões distantes do seu sítio original (Negre-Salvayre et al., 2008; Uchida, 2003). Sua capacidade de causar efeitos citotóxicos e alterações em diversas funções celulares depende principalmente da formação de adutos intra e intermolecular com biomoléculas como proteínas (Grimsrud et al., 2008), DNA (Marnett, 2002, 1999) e fosfolipídios (Reis e Spickett, 2012). Dentre estes intermediários reativos destaca-se o MDA descrito como o produto mais mutagênico de peroxidação lipídica, e o 4-HNE, o mais tóxico (Esterbauer et al., 1990).

A nível celular, os efeitos lipotóxicos mediados por lipídios oxidados incluem alterações na composição e permeabilidade de membranas celulares, modificação na estrutura e alterações funcionais de enzimas e receptores, estresse do retículo endoplasmático, além de danos ao DNA (Orlicky et al., 2011; Zimmeman. J.J, 1995). O dano oxidativo pode afetar também a composição da membrana mitocondrial resultando em despolarização e desacoplamento da fosforilação oxidativa, com profundos impactos no metabolismo energético da célula. Em última instância o dano mitocondrial pode levar à liberação de citocromo C para o citosol e consequente ativação de caspases levando a morte celular por apoptose (Schaffer, 2003). A concentração fisiológica de produtos da lipoperoxidação é baixa, entretanto este panorama muda em condições patológicas. As concentrações plasmáticas de MDA e HNE aumentam significativamente em pacientes com diabetes mellitus (Slatter et al., 2000), asma (Wood et al., 2003), e no cérebro de pacientes com doença de Parkinson e Alzheimer (Barnham et al., 2004). Em pacientes com artrite reumatóide, esclerose sistêmica, lúpus eritematoso ou falência renal crônica os níveis séricos de HNE aumentam de 3 a 10 vezes em comparação com os valores fisiológicos (Siems e Grune, 2003).

A peroxidação lipídica também é um importante componente das lesões mediadas por radicais livres durante a sepse (Schaffer, 2003). Os primeiros trabalhos realizados por Takeda e colaboradores já demonstravam o aumento nos níveis plasmáticos de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em pacientes com sepse grave se comparados com os controles, sugerindo aumento da peroxidação lipídica (Takeda et al., 1984). Posteriormente, Goode e colaboradores demonstraram uma correlação entre aumento de TBARS plasmáticos em pacientes que desenvolveram três ou mais órgãos com disfunção secundária (Goode et al., 1995). Isoprostanos e isofuranos são subprodutos estáveis de peroxidação lipídica e marcadores específicos do estresse oxidativo *in vivo*. Os níveis plasmáticos de F2-isoprostanos e isofuranos foram demonstrados estar associados com falência renal, hepática e de coagulação em pacientes com sepse grave, sugerindo que a peroxidação lipídica é uma característica proeminente da falência de múltiplos órgãos (Ware. et al., 2010).

#### 1.1.6 Alterações do metabolismo lipídico na sepse

O metabolismo de todos os tipos principais de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) é desregulado na sepse e muitas dessas perturbações metabólicas são mediadas por alterações no sistema endócrino e no sistema nervoso autônomo (Khardori e Castillo, 2012; Norbury et al., 2007). A ativação destes dois sistemas ocorre simultaneamente e, em geral, aumenta o consumo de energia. Os lipídios são a principal fonte de energia em pacientes com infecções e adaptações em seu metabolismo são características em pacientes sépticos (Michie, 1996). A chamada lipemia da sepse é marcada pelo aumento na circulação de triacilglicerol e ácidos graxos livres (Andersen et al., 2004; Gallin et al., 1969) e ocorre devido a redução na oxidação apresentada em diferentes órgãos, principalmente no fígado, e o aumento da lipólise no tecido adiposo (Johnson et al., 2005; Macfarlane et al., 2008; Wang e Evans, 1997).

Estas alterações ocorrem em resposta à massiva liberação de catecolaminas, corticosteroides e mediadores inflamatórios (Khardori e Castillo, 2012; Klein et al., 1991). Em conjunto, esses mediadores antagonizam a ação insulina no tecido adiposo e hepático gerando resistência a insulina, hiperglicemia e aumento da lipólise (Lang, 1992). Além do aumento de ácidos graxos circulantes, os pacientes com sepse grave tem baixos níveis de colesterol e conseqüentemente de

lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e apolipoproteína A-I (Apo A-I) (Chenaud. et al., 2004; Dimopoulou, 2014; Wendel et al., 2007). Concentrações mais baixas de HDL e LDL estão associados a pacientes que não sobreviveram ao quadro séptico e por isso seus níveis são apontados como potenciais parâmetros preditores de mortalidade (Chien et al., 2005; Lekkou et al., 2014; Ngaosuwan et al., 2015). Além disso, McDonald e colaboradores relataram que o pré-tratamento com HDL reconstituído (rHDL) reduziu a gravidade dos danos a órgãos como pulmão, fígado e intestino induzidos pelo estímulo com LPS em ratos por mecanismos envolvendo a expressão de moléculas de adesão como p-selectina (McDonald et al., 2003). Além disso, animais *knockout* para Apo A-I apresentam maior susceptibilidade a sepse por apresentar baixa capacidade de produção de corticosterona, deficiência nos processos de neutralização ou remoção do LPS, e o recrutamento de leucócitos prejudicado (Guo et al., 2013).

Os mecanismos responsáveis por estas alterações no metabolismo lipídico não estão completamente elucidados, entretanto fatores como a inibição de lipoproteína lipases, a superprodução de triglicerídios pelo fígado, o desequilíbrio entre síntese e utilização dos ácidos graxos, e a influência de vias de sinalização mediadas por citocinas e endotoxinas certamente contribuem para este processo (Large e Arner, 1998; van Leeuwen et al., 2003). A respeito deste último, estudos demonstraram a contribuição do LPS na redução da oxidação de ácidos graxos livres por induzir a redução da expressão de enzimas centrais no processo da beta-oxidação como a carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT-1) e a acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD) no fígado, rim e músculo esquelético (Feingold et al., 2008). Estas proteínas estão sob o controle dos receptores nucleares PPAR $\alpha$  e PGC-1 $\alpha$ , ambos também tem os níveis reduzidos pelo estímulo por LPS, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Feingold et al., 2008; Wang e Evans, 1997).

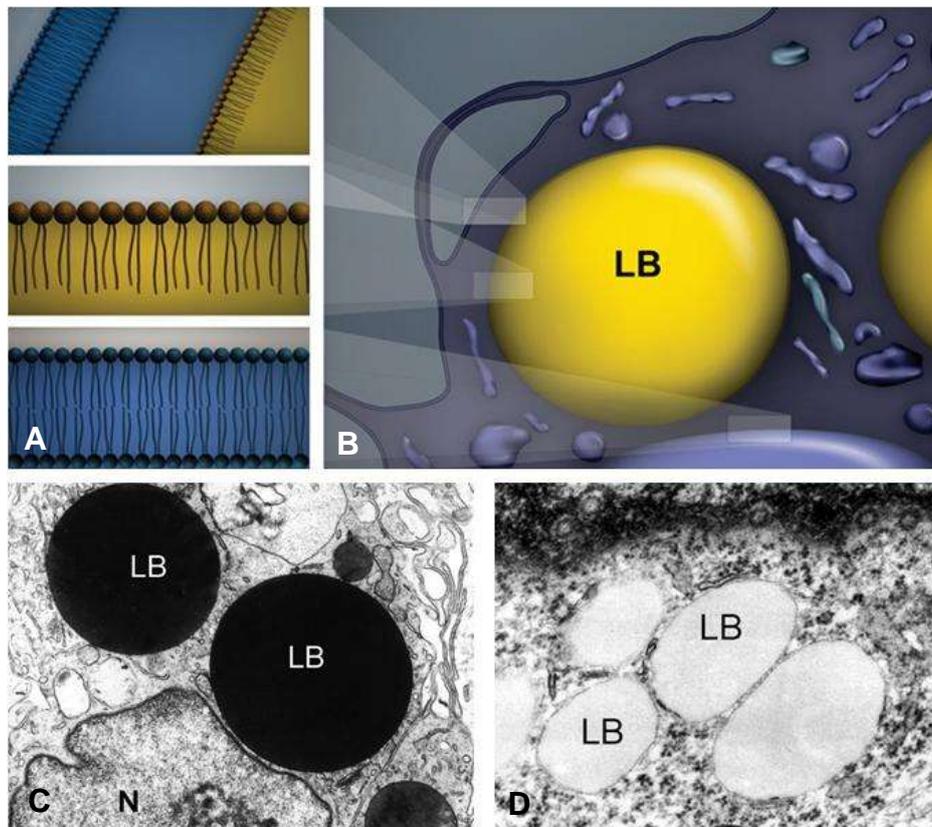
A nível celular, alterações no metabolismo lipídico podem ser frequentemente observadas sob a forma de pequenas gotas lipídicas acumuladas no citoplasma das células conhecidas como corpúsculos lipídicos (CLs). Aumento na formação de CLs durante a sepse tem sido demonstrados tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Pacheco e colaboradores, por exemplo, demonstraram o aumento de CLs em leucócitos de pacientes sépticos em comparação com indivíduos saudáveis. O modelo de sepse por injeção intratorácica de LPS em camundongos também induziu o aumento destas organelas de maneira dose e tempo-dependente (Pacheco et al., 2002). A biogênese de CLs é um evento altamente regulado e as vias de sinalização

envolvidas dependem do tipo celular e do estímulo (P.T. Bozza et al., 2009). Estudos prévios demonstraram que o aumento no número destas organelas induzido por diferentes modelos de sepse depende de vias de sinalização mediadas por TLR4, CD14, CD11b, PAF (fator ativador de plaquetas) e MCP-1 (Gomes et al., 2006; Leite et al., 2005a; Pacheco et al., 2007, 2002). O acúmulo de CLs em tecido que não o adiposo é considerado um marcador de doenças inflamatórias e infecciosas (Rossana C N Melo et al., 2006).

## **1.2 Corpúsculos lipídicos (CLs)**

Os CLs, também conhecidos como gotas lipídicas ou adipossomos, são organelas intracelulares ricas em lipídios neutros presentes em virtualmente todos os organismos (Alvarez et al., 1996; Murphy, 2012; Service, 2009; Wältermann et al., 2005; Zhang et al., 2010). A concentração de lipídios no citoplasma das células é uma característica altamente conservada, provavelmente por seu papel no estoque de energia e homeostase lipídica (Listenberger et al., 2003; Masuda et al., 2006) e por muito tempo estas foram as únicas funções atribuídas aos CLs. No entanto, estudos recentes baseados na estrutura, composição, biogênese e interação com outras organelas apontam para um papel muito mais amplo, contribuindo para uma mudança na percepção de que CLs sejam apenas sítios de estoque de lipídios. Atualmente, os CLs são reconhecidos como organelas dinâmicas e funcionalmente ativas envolvidas no metabolismo, sinalização celular e inflamação (Bozza et al., 2009; Farese e Walther, 2009; Fujimoto et al., 2008; Martin e Parton, 2006a).

Os CLs não são organelas homogêneas, o seu teor de lipídios e proteínas pode variar de acordo com tipo celular e estado de ativação. Os CLs são estruturas geralmente esféricas, compostas principalmente de triacilgliceróis (TAG) e colesterol ésteres, e não são delimitadas por uma membrana bilaminar clássica (Figura 4 A), mas sim por uma monocamada de fosfolipídios e colesterol (Tauchi-Sato et al., 2002). Esta organização única desafia a compreensão de como ocorrem as vias de transporte de proteínas e lipídios, uma vez que o arranjo não se encaixa nos mecanismos clássicos de transporte vesicular. Por outro lado, favorece a sua distinção de outras organelas sob o microscópio eletrônico de transmissão (Melo et al., 2011) (Figura 4 C, D).



**Figura 4: Organização ultraestrutural dos CLs.** (A,B) Representação esquemática dos CLs enfatizando sua característica distintiva de outras organelas, seu envoltório constituído de uma camada única de fosfolipídios. (C,D) As micrografias eletrônicas mostram a heterogeneidade dos CLs a nível ultraestrutural variando de fortemente elétron-densos a elétron-lúcidos de acordo com o tipo celular e o estado de ativação. Adaptados de (Melo et al., 2011).

A biogênese dos CLs não é um processo completamente compreendido. Entre as várias teorias que tentam explicar este processo há relativo consenso de que os CLs têm origem no RE. Semelhanças no conteúdo lipídico e proteico entre essas organelas e estudos ultra-estruturais sugerem fortemente essa derivação (Bartz et al., 2007a; Ozeki et al., 2005; Ploegh, 2007; Robenek et al., 2004; Tauchi-Sato et al., 2002). O modelo clássico da biogênese de CLs propõe a síntese e acúmulo de lipídios neutros entre os dois folhetos da bicamada lipídica do RE. Depois de atingir determinado tamanho, os CLs brotam da membrana do RE como organelas independentes ricas em lipídios neutros, rodeado por uma heme-membrana e com a proteína desprovida de domínio de trans-membrana (Martin e Parton, 2006b; Murphy, 2001; Robenek et al., 2004). No entanto, a identificação de proteínas que atravessam a membrana permeando o centro dos CLs, tais como caveolinas e ciclooxigenases (Bozza et al., 1997; Dvorak et al., 1992; Fujimoto et al., 2001; Pol et al., 2001) associado à visualização de estruturas membranosas ou membranotubular

dentro dessas organelas, levaram à formulação de uma nova teoria chamada de “modelo de englobamento”, que propõe que o CL em formação incorpora projeções de membrana do RE, de ambos os folhetos, citoplasmática e luminal (Bozza et al., 2009; Wan et al., 2007).

Mais de 160 espécies de lipídios foram identificadas nos CLs, presentes em maiores ou menores quantidades. Em adipócitos, os TAGs são largamente dominantes, enquanto que em macrófagos espumosos, colesterol ésteres é mais abundante (Bartz et al., 2007a; Grillitsch et al., 2011; Leber et al., 1994). Uma variada gama de proteínas está associada à superfície dos CLs através de porções moleculares de natureza anfipática e/ou hidrofóbica (Boulant et al., 2006; Bussell e Eliezer, 2003; Ostermeyer et al., 2004; Subramanian et al., 2004) e outras foram detectadas no seu núcleo lipídico hidrofóbico (Robenek et al., 2009, 2005). O grupo mais abundante e bem caracterizado de proteínas associado com os CLs são denominados família PAT e, por conseguinte, são frequentemente utilizados como marcadores moleculares destas organelas (Bickel et al., 2009; Brasaemle, 2007). Membros desta família partilham semelhanças de sequência que inclui o domínio conservado PAT, principalmente na sua região N-terminal (Bussell e Eliezer, 2003; Lu et al., 2001; Miura et al., 2002).

As proteínas da família PAT são as principais proteínas estruturais presentes na superfície dos CLs, incluem a perilipina, ADRP (*adipose differentiation-related protein*), TIP47 (*tail-interacting protein of 47kDa*), também chamadas PLIN 1, PLIN2 e PLIN3, respectivamente. Mais recentemente, outras proteínas desta família foram descritas (Dalen et al., 2007; Wolins et al., 2006). Perilipina é a proteína mais abundante em CLs de adipócitos e atua regulando mecanismos de lipólise. Em condições basais, a perilipina protege os CLs da ação das lipases, mas em resposta à estimulação hormonal, esta proteína é fosforilada por cinases A dependente de AMPc (PKA) e recruta lipases sensível a hormônios, dentre outras lipases para os CLs, permitindo o acesso destas enzimas ao seu substrato promovendo a lipólise (Greenberg et al., 1991; Sztalryd et al., 2003; Tansey et al., 2004). ADRP, que é expressa ubiquamente, têm funções na incorporação e acumulação de lipídios em diferentes tipos de células (Brasaemle et al., 1997). TIP47 foi originalmente identificada como uma proteína envolvida no tráfego de membrana a partir da rede trans do Golgi. Por existir em outros compartimentos subcelulares, mas ser rapidamente recrutados após estímulo lipogênicos, TIP47 foi denominada proteína permutável associada aos CLs (Wolins et al., 2001).

Nos últimos anos, o número de proteínas identificadas nos CLs aumentou bastante, principalmente devido aumento dos estudos em proteômica (Beller et al., 2006; Cermelli et al., 2006; Hodges e Wu, 2010). Muitas destas proteínas estão envolvidas na biossíntese, transporte e catabolismo de lipídios. Os CLs compartimentalizam enzimas como acil-CoA sintetase, acil-CoA carboxilase, esqualeno epoxidase, lanosterol sintase, triglicerídeo lípase, álcool desidrogenase, dentre outras (Brasaemle et al., 2004; Fujimoto et al., 2004; Liu et al., 2004; McGookey e Anderson, 1983; Wan et al., 2007).

No entanto, associações inesperadas também foram encontradas, incluindo proteínas de origem ribossomal, mitocondrial e componentes do RE. Foram identificadas também proteínas relacionadas ao transporte vesicular, fusão de membranas e de associação ao citoesqueleto, como proteínas da família das Rabs, fator de ribosilação de ADP (ARF), pequenas GTPases e caveolinas, o que sugere que os corpúsculos lipídicos possam sofrer eventos de fusão e fissão, além de poder interagir com as demais organelas (Bartz et al., 2007b; Boström et al., 2007; Fujimoto et al., 2001; Hodges e Wu, 2010; Ozeki et al., 2005; Wu et al., 2000). Proteínas envolvidas na sinalização celular e na produção de mediadores inflamatórios foram detectadas em CLs de diferentes tipos celulares sob diferentes condições (Bozza et al., 1997; Chen et al., 2002; Dvorak et al., 1993; Umlauf et al., 2004; Yu et al., 2000, 1998). Em conjunto, estes achados destacam os CLs como organela especializada, dinâmica, com papéis que vão muito além da regulação do metabolismo lipídico, desempenhando funções na sinalização celular, no tráfego de membrana e na formação e secreção de mediadores inflamatórios.

### 1.2.1 **CLs e a inflamação.**

Um importante avanço no entendimento biologia dos CLs foi a observação de que estas organelas são induzidas em associação a resposta inflamatória. Leucócitos não ativados, incluindo macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, apresentam poucos CLs os em seu citoplasma (entre 1 e 5). Entretanto, após estimulação inflamatória de diferentes origens, um dramático aumento ocorre no número e tamanho destas organelas (Bozza and Bandeira-Melo, 2005). O acúmulo de CLs em leucócitos tem sido observado em diversas patologias de origem inflamatória e infecciosa, como em macrófagos provenientes de lesões ateroscleróticas (Paul et al., 2008), eosinófilos em inflamações alérgicas (Vieira-de-Abreu et al., 2010),

células cancerosas (Accioly et al., 2008), em leucócitos do lavado pleural e de granulomas formados durante infecções por micobactérias (Cardona et al., 2000; D'Avila et al., 2006), em macrófagos presentes no peritônio e no influxo inflamatório no tecido cardíaco durante a infecção experimental por *T. cruzi in vivo* (Melo et al., 2003).

A formação de CLs durante o processo inflamatório é um evento regulado e, de acordo com o estímulo, dependem de vias de sinalizações específicas. Por exemplo, prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), um potente agente quimiotático de leucócitos, desencadeia a formação de CLs via receptor acoplado à proteína G em eosinófilos, mas não em macrófagos (Mesquita-Santos et al., 2006) O PAF, mas não liso-PAF, através de seu receptor, induz formação de CLs em neutrófilos e eosinófilos (Bozza et al., 1998, 1996) e as quimiocinas eotaxina (CCL11) e RANTES (CCL5), agindo via receptores CCR3, estimulam formação de CLs em eosinófilos (Bandeira-Melo et al., 2001; Vieira-De-Abreu et al., 2005). Durante as infecções por *Mycobacterium bovis* BCG e por *T. cruzi*, a formação de corpúsculos lipídicos tem mostrado ser dependente do receptor semelhante a Toll 2 (TLR2), mas não Toll 4 (TLR4) (D'Avila et al., 2011, 2006).

Durante o processo inflamatório os CLs funcionam como sítios de formação de mediadores inflamatórios, os eicosanóides. Os eicosanóides são mediadores lipídicos formados a partir do metabolismo do ácido araquidônico. Os CLs compartimentalizam proteínas envolvidas no metabolismo e transporte do ácido araquidônico, bem como todas as enzimas necessárias para a síntese dos eicosanóides, incluindo fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Wooten et al., 2008) ciclooxigenases (COX) (Dvorak et al., 1993), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sintase, 5- e 15-lipoxigenase (5-LO e 15-LO) e leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) (Bozza et al., 1997). Consistente com estas observações, estudos tem mostrado significativa correlação entre o aumento no número de CLs e a formação de eicosanoides como LTC<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub>.

Durante as infecções por *T. cruzi*, o aumento no número de CLs em macrófagos inflamatórios se mostrou positivamente correlacionado com a geração de PGE<sub>2</sub>, indicando a importância desta organela na produção de eicosanóides durante a doença de Chagas (Melo et al., 2003). Resultado similar foi observado durante a infecção por BCG, onde os CLs foram identificados como principal sítio de localização de PGE<sub>2</sub> nas células infectadas (D'Avila et al., 2006). Sob condições alérgicas, os CLs foram apontados como principais sítios de localização de LTC<sub>4</sub> em eosinófilos (Bandeira-Melo et al., 2001). LTB<sub>4</sub> foi identificado em grandes

quantidades nestas organelas durante a sepse (Pacheco et al., 2007; Pacheco et al., 2002) Além da produção de eicosanóides, os CLs podem desempenhar outros papéis durante as desordens inflamatórias ou em resposta a infecções por compartimentalizar citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em leucócitos ativados. A primeira citocina detectada nos CLs foi o TNF-alfa, a partir de imunomarcção ultraestrutural em biópsias de pacientes com doenças de Crohn (Beil et al.,1995). Posteriormente esta mesma citocina foi detectada em CLs de leucócitos derivados de pacientes sépticos (Pacheco et al., 2002). Em eosinófilos humanos, além da detecção de TNF-alfa, foram identificados o fator quimiotático de linfócitos RANTES e IL-16 (Lim et al.,1996). O fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) foi demonstrado CLs em mastócitos pulmonares (Dvorak et al., 2001). Entretanto até o momento pouco se sabe sobre a função destas moléculas dentro dos CLs.

### 1.2.2 CLs e a lipotoxicidade

Lipotoxicidade tem sido implicada na patogênese de doenças humanas clinicamente importantes (Schaffer, 2003). No entanto, os mecanismos celulares que determinam se o excesso de lipídios é bem tolerado ou citotóxico permanecem em grande parte desconhecida. A princípio, a formação de CLs tem sido apontada como citoprotetora, uma vez que protege as células dos danos gerados por altas concentrações de ácidos graxos livres (Herms et al., 2013). Além disso, o armazenamento de lipídios sob a forma de TAG é considerado segura devido à sua inércia química. (Listenberger et al., 2003). As vias intracelulares que regulam a dinâmica de estoque e liberação de ácidos graxos, através do metabolismo dos TAG, tem sido apontadas como determinantes se haverá acúmulo de metabólitos lipídicos e efeitos tóxicos.

O conceito de que a acumulação de TAG pode proteger da lipotoxicidade induzida por ácidos graxos foi introduzido por Listenberger e colaboradores. Em seu trabalho, os autores observaram que a incubação de células com excesso de palmitato, um ácido graxo saturado que tem baixa incorporação sob a forma de TAGs, induz a morte celular desencadeada por lipotoxicidade. Entretanto, a co-incubação com o ácido graxo insaturado oleato reverte este efeito por direcionar o palmitato para os reservatórios de TAG intracelular, os CLs, limitando sua capacidade de estimular vias de apoptose. Utilizando células com a síntese de TAG

prejudicada (*Dgat1*<sup>-/-</sup>) até o oleato foi capaz de induzir lipotoxicidade e morte celular (Listenberger et al., 2003). Esses resultados sugerem que o sequestro de ácidos graxos sob a forma de TAG nos CLs pode resgatar as células dos efeitos lipotóxicos dos ácidos graxos saturadas.

Em concordância, animais *knockout* para a *Dgat1*(*acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase*), a última enzima envolvida na síntese de TAG, desenvolvem insuficiência cardíaca e morrem prematuramente. As análises do tecido cardíaco revelaram aumento nos níveis de diacilglicerol (DAG) e ceramidas, sugerindo que a diminuição no sequestro destes metabólitos lipídicos tóxicos sob a forma de TAG pode contribuir para insuficiência cardíaca (Liu et al., 2014). O mesmo aconteceu em consequência da super expressão de ATGL (*lipase adiposa de triacilglicerídeos*) em cardiomiócitos, onde o aumento dos ácidos graxos livres desencadeou mecanismos de lipotoxicidade via estresse do RE (Bosma et al., 2014). Estudos recentes demonstraram que a ausência de perilipina 5 (PLIN 5 ou OxPAT), proteína reguladora dos processos de estoque e hidrólise de TAG nos CLs em tecidos oxidativos, induz a redução do número destas organelas em paralelo com uma elevada taxa de lipólise, produção de ROS e injúria lipotóxica em hepatócitos e cardiomiócitos (Kuramoto et al., 2012; Pollak et al., 2015; Wang et al., 2014).

Apesar de todas estas evidências apontando para um papel citoprotetor de se armazenar ácidos graxos livres em CLs, recentemente Plötz e colaboradores apresentaram uma visão contrária, demonstrando que a deficiência nas proteínas PLIN1 e PLIN2 em células produtoras de insulina não aumentam sua sensibilidade aos efeitos citotóxicos mediados pelo ácido palmítico (PA), apesar de reduzir significativamente a formação de CLs. Além disso, a co-incubação de PA com ácidos graxos insaturados (ácido oléico) em diferentes concentrações protege as células dos efeitos citotóxicos do PA mesmo nas células deficientes em PLIN1 e PLIN2, o que sugere que os CLs não teriam função essencial nestes mecanismos protetores (Plötz et al., 2016).

O papel dos CLs nos eventos lipotóxicos mediados por lipídios peroxidados também é controverso. Em 2015, ao estudar o desenvolvimento do sistema nervoso central de drosófilas, Baley e colaboradores observaram que o estresse oxidativo é capaz de induzir uma redistribuição dos ácidos graxos, incluindo ácidos graxos insaturados, das membranas para os CLs, induzindo um aumento no número destas organelas por mecanismos dependentes de fosfolipase D, lipinas e DGAT1. Os autores também demonstraram que dentro dos CLs os ácidos graxos poliinsaturados

estão mais protegidos da peroxidação lipídica do que quando associados às membranas, desta forma os CLs forneceriam um ambiente de proteção que minimiza a reação em cadeia de peroxidação lipídica e limita os níveis de ROS. Este papel antioxidante dos CLs protegeria não só as células da glia, como também células-tronco neuronais e sua progênie (Bailey et al., 2015).

Em contrapartida outros trabalhos sugerem que os CLs podem conter lipídios peroxidados e mediar danos lipotóxicos. No mesmo ano de 2015, Liu e colaboradores, estudando modelos de doenças neurodegenerativas desencadeadas por defeitos mitocondriais, observaram um acúmulo de CLs em células da glia ocorrendo no início ou precedendo o processo de neurodegeneração tanto em drosófilas quanto em camundongos. O simples acúmulo de CLs não foi capaz de induzir a neurodegeneração neste modelo. Entretanto, na presença de ROS, gerados pela disfunção mitocondrial, os lipídios acumulados nos CLs sofreram peroxidação e foram apontados como indutores de morte neuronal. Esta hipótese foi fortalecida uma vez que a redução farmacológica ou genética do número e tamanho dos CLs bem como da formação de ROS significativamente retardou o processo de neurodegeneração (Liu et al., 2015).

Um potente efeito lipotóxico pode emergir quando associamos um quadro de estresse oxidativo e acúmulo de lipídios. O estresse oxidativo é um componente da patogênese da esteatose hepática de origem alcoólica. O metabolismo do etanol induz aumento na produção de ROS por via mitocondrial e microssomal, este por sua vez é capaz de reagir com a abundante carga lipídica gerando lipídios peroxidados (Lieber, 2004; Tuma e Casey, 2003). Neste contexto, Orlicky e colaboradores demonstraram a presença de adutos de 4-HNE co-localizando com as proteínas da família PAT no fígado de animais submetidos à dieta suplementada com etanol, sugerindo que as proteínas da família PAT ou moléculas associadas encontradas na superfície dos CLs podem ser alvo de peroxidação lipídica (Orlicky et al., 2011). Ainda não se sabe qual o impacto destas modificações nas funções destas proteínas, principalmente aquelas relacionadas ao controle da lipólise. Os autores também destacam que a distribuição espacial desta marcação de 4-HNE nas zonas do fígado se correlaciona com a de marcadores do estresse de RE, a calreticulina e a Grp78.

## 2 Justificativa

A sepse, como exposto, é uma patologia onde ocorrem ambos os eventos, estresse oxidativo e disfunção do metabolismo lipídico. Apesar disso, o papel dos efeitos lipotóxicos na disfunção celular e consequente disfunção orgânica durante a sepse ainda é pouco estudado. Nos últimos anos tornou-se evidente a associação entre o aumento do estresse oxidativo e a progressão para estágios mais graves do quadro séptico, incluindo a disfunção orgânica. Adicionalmente a circulação de lipídios peroxidados no plasma de pacientes sépticos aumenta, e seus níveis correlacionam com a gravidade do quadro e com os eventos de falência orgânica, (Ware et al., 2010). Os CLs tem papel chave no metabolismo dos TAG e são as principais organelas de estoque de lipídios intracelular. Seu número e tamanho aumentam durante processos infecciosos e inflamatórios, incluindo durante a sepse. Mesmo assim pouco se sabe sobre a associação entre estes dois eventos, a saber, a produção de ROS e a biogênese de CLs e qual seria o papel destas organelas nos danos celulares mediados por lipídios peroxidados durante a sepse. Entender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos quadros de sepse, principalmente nos casos de sepse grave e disfunção orgânica, é de suma importância para o estabelecimento de novos alvos terapêuticos e melhor manejo clínico da doença.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar o papel de ROS na biogênese e peroxidação de componentes dos CLs durante a sepse experimental.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a cinética de formação de CLs e da produção de ROS após estímulo por LPS + IFN $\gamma$ , *in vitro*;
- Avaliar a relação entre disfunção mitocondrial e formação de CLs;
- Estudar a participação de ROS produzido pela ativação da enzima NADPH oxidase na biogênese de CLs após estímulo por LPS + IFN $\gamma$ , *in vitro*;
- Estudar as consequências do estresse oxidativo no conteúdo lipídico e proteico dos CLs;
- Estudar a biogênese de CLs, alterações ultraestruturais e dano celular durante a sepse experimental *in vivo*;

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos adultos machos das linhagens *Swiss Webster* (experimentos de microscopia eletrônica) e C57BL/6 (demais experimentos), com peso entre 20 e 25g, fornecidos pelo biotério central da Fundação Oswaldo Cruz e mantidos em gaiolas plásticas com cinco animais, com livre acesso à água e ração, em uma sala com temperatura de 22 a 24°C, com ciclos de 12 h luz/escuro nos biotérios do Pavilhão Osório de Almeida e Pavilhão Hélio e Peggy Pereira (HPP), Fiocruz-RJ. Todos os procedimentos experimentais seguiram as recomendações da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Fiocruz sob o Protocolo # LW32/12.

### 4.2 Ligadura e punção cecal (CLP)

Para induzir a sepse polimicrobiana foi utilizado o modelo de ligadura e punção cecal (CLP). Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina 112,5 mg/kg e xilazina 10 mg/kg e submetidos a laparotomia, o ceco foi exposto e ligado com linha de algodão (4.0) abaixo da junção ileocecal para evitar obstrução. Em seguida, o ceco foi perfurado com uma agulha de 21 gauge e uma coluna de 1mm de fezes foi extravasada de cada perfuração para induzir a sepse. O número de perfurações variou de acordo com o grau de gravidade pretendida, sendo 2 furos (sepse branda) e 9 furos (sepse grave) (grupo CLP). Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam 1,0 mL de solução salina subcutânea para reposição volêmica. Os animais falso operados (grupo SHAM) foram submetidos a cirurgia em que o ceco foi apenas exposto, mas não ligado e nem perfurado. Após 6 e 24 horas da cirurgia, os animais foram tratados intraperitonealmente com antibiótico de Ertapenem (75 mg/kg) e acondicionados em caixas apropriadas para a observação diária.

Nos experimentos para coleta de amostra para microscopia eletrônica o CLP foi realizado em camundongos *Swiss*, o ceco foi ligado com fio de sutura 3.0 e perfurado duas vezes com agulha de 18 gauge.

**Pré-tratamento com apocinina:** Uma parte dos animais submetidos à sepse grave (9 furos) ou SHAM foi pré-tratada com apocinina (Sigma-Aldrich, W508454) com o

objetivo de inibir a ação da enzima NADPH oxidase. A apocinina foi administrada intraperitonealmente (20mg/Kg) 1h antes da cirurgia de CLP. Esta concentração de apocinina foi escolhida em função de outro estudo do grupo que administrou esta mesma dose em camundongos (Hernandes et al., 2014).

#### **4.3 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea**

Camundongos C57Bl/6 foram eutanasiados em câmara de gás carbônico e tiveram o fêmur de ambas as pernas removidas. No fluxo laminar, as epífises dos fêmures foram removidas e o interior do osso lavado com 1mL de tampão fosfato salina (PBS) estéril com auxílio de uma seringa de 1 mL. A suspensão de células foi quantificada em câmara de Neubauer e plaqueadas na proporção de  $4 \times 10^6$  células/placa de petri em 10 ml do meio BBM – *bone-marrow macrophage* (RPMI-1640 + 1 % L-glutamina, 1% penicilina e estreptomicina, + 20% soro fetal bovino (SFB) + 30% do sobrenadante da cultura de L929). Após 5 dias de incubação em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, foram adicionados mais 10 mL do meio BMM completo como descrito anteriormente e as células permaneceram em incubação até o 7º dia. O sobrenadante da cultura foi recolhido e descartado. Para ressuspender as células aderidas, 5 mL de PBS estéril gelado foi adicionado à placa de petri e, posteriormente as células foram incubadas por 10 min a 4°C. Após esse tempo, as células foram recolhidas da placa de petri, quantificadas, ressuspensas no meio RPMI-1640 contendo 10% SFB, 1% de penicilina, 1% de estreptomicina e plaqueadas de acordo com o desenho experimental.

#### **4.4 Obtenção de macrófagos p22<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> por CRISPR-Cas9**

Os clones de macrófagos p22<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> foram cedidos gentilmente pela doutoranda Elisa Prestes, aluna do doutor Marcelo Torres Bozza, pesquisador do Instituto de microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brevemente, a seqüência 5' TGTCTGCTGGAGTATCCCCG3' foi selecionada como RNA guia (sgRNA) direcionada ao éxon 3 da seqüência da p22<sup>phox</sup> murina (CYBA, GenBank, NM – 007806.3). Esta seqüência e seu reverso complementar foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Inc. Coralville, IA, USA) e então inseridos no plasmídeo vetor pX330-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene, plasmídeo #42230) previamente digerido com a enzima de restrição BbsI (Thermo Fisher

Scientific, ER1011). Os plasmídios foram clonados e propagados em *E. coli* DH5 alfa e extraídos por miniprep de acordo com Sambrook (Russell and Sambrook, 2001). Macrófagos murinos imortalizados em fase exponencial de crescimento foram co-transfectados com 10µg do plasmídio pX330-p22exon3 e 2µg do plasmídio eGFP (Lonza) por eletroporação utilizando o sistema Nucleofector II e o KitCell Line Nucleofector® Kit V com suplemento I, conforme especificação dos fabricantes.(Lonza). Após 48h a expressão de GFP foi confirmada por citometria e as células positivas foram selecionadas por *cell sorting* utilizando MoFlo Astrios cell sorter (Beckman Coulter, Brea, CA). Cerca de 6% das células transfectadas eram positivas para GFP e foram plaqueadas em placas de 96 poços considerando 2 células/poço. Após duas semanas, os poços que tinha apenas um grupamento de células (indicando expansão clonal) foram coletados e as células colocadas para expandir em placa de 24 poços, depois em placa de 12 e 6 poços. Os clones selecionados foram submetidos a *Western blotting* usando anticorpo policlonal contra p22<sup>phox</sup> (Santa Cruz, sc-20781). Os clones que apresentaram a banda no peso molecular esperado (20-26 kDa) foram descartados. Já os clones confirmados como negativos para a expressão de p22<sup>phox</sup> foram submetidos ao sequenciamento para confirmar alteração na sequência. Todos os clones negativos no *western blotting* apresentaram alguma deleção na região esperada do corte realizado pela Cas9 (entre o 4º e o 3º nucleotídeos lendo na direção 3'-5', ou seja, no final do sgRNA). Foi selecionado para os experimentos um clone que apresentou a deleção de cerca de 20 nucleotídeos no éxon 3 do gene da p22<sup>phox</sup> o que provavelmente induziu uma mudança de frame de leitura do gene.

#### **4.5 Experimentos *in vitro*: estímulos e pré-tratamentos**

Macrófagos derivados de medula óssea foram estimulados com 500ng/mL de LPS sorotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich, L2630) e 10ng/mL de interferon γ murino recombinante (Peprotech, 315-05). Realizou-se também o tratamento com as drogas antimicina A (1µg/mL) (Sigma-Aldrich, A8674), rotenona (1µg/mL) (Sigma-Aldrich, R8875), oligomicina A (2µg/mL) (Sigma-Aldrich, 75351) e o FCCP (1µM) (Sigma-Aldrich, C2920).

Para avaliar o papel de ROS utilizamos o antioxidante específico para ROS mitocondrial para Mito-TEMPO (Enzo Lifesciences, Inc. ALX-430-150) na dose de 100µM, o inibidor da NADPH oxidase apocinina (Sigma-Aldrich, W508454),

majoritariamente na dose de 500µM todos adicionados à cultura 1h antes do estímulo com LPS + IFN $\gamma$  e permaneceram todo o tempo de estímulo.

#### **4.6 Coloração e contagem de CLs:**

**Oil red O (ORO):** A solução estoque de Oil Red O (Sigma-Aldrich, O0625) foi preparada em isopropanol P.A na concentração de 0,3%. No momento da marcação 3 partes da solução estoque foram diluída em 2 partes de água destilada. A solução foi filtrada em filtro de papel para evitar precipitados. Após a fixação das células, as lâminas foram coradas com ORO (300µL/poço) por 2-5 min, lavadas com isopropanol 30% e posteriormente com água destilada (5x). As lâminas com montadas em solução de glicerol 70% para visualização em campo claro ou com o meio de montagem Vectashild contendo DAPI (Vector Laboratories – H-1.200) para visualização em fluorescência.

**Contagem de CLs:** Após a coloração com ORO, foram quantificados o número de CLs de 50 células consecutivas e os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM. As análises foram feitas no microscópio Olympus BX 41, utilizando objetiva de 100x em contraste de fase, permitindo ver o limite celular sem a necessidade de contra coloração.

**Nile Red:** O 9-dietilamino-5H-benzo [a] fenoxazin-5-ona também conhecido como Nile red (Sigma-Aldrich, N3013) foi diluído em acetona na concentração de 1 mg/mL (solução estoque). No momento da marcação, preparou-se a solução de uso diluindo-se a solução estoque na proporção de 1:20.000 em PBS. As células foram encubadas com a solução de uso de Nile red por 15 min, protegidas da luz, posteriormente lavadas com PBS.

**Bodipy 493/503:** 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno ou BODIPY® 493/503 (Molecular Probes, D3922) foi diluído em DMSO na concentração de 1mM (solução estoque). No momento da marcação preparou-se a solução de uso diluindo-se a solução estoque na proporção de 1:5.000 em PBS. As células foram incubadas com a solução de uso de bodipy por 15 min, protegidas da luz, posteriormente lavadas com PBS.

**LipidTox Red:** HCS LipidTOX™ Red neutral lipid stain (Molecular Probes, H34476) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1mM (solução estoque). No momento da marcação preparou-se a solução de uso diluindo-se a solução estoque na proporção de 1:2.000 em PBS. As células foram incubadas por 20 min, protegidas da luz e, posteriormente lavadas com PBS.

#### 4.7 Imunofluorescência (ADRP)

As células foram fixadas em formalina 3% por 10 min, posteriormente lavadas com PBS e permeabilizadas com triton 0,2% em PBS por 20 min. Após a permeabilização, as células foram incubadas com solução de bloqueio, soro de burro (Jackson Laboratories, 017-000-121) 1% em PBS por 1 h. As células foram incubadas com o anticorpo primário guinea pig contra ADRP (Fitzgerald, 20R-AP002), na concentração de 5µg/mL em PBS por 24 h, a 4°C. Após o período de incubação as células foram lavadas 3x com PBS por 10 min. Em seguida foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com Alexa-488 (Molecular Probes, A-11073) diluídos em PBS na proporção de 1:1000 e incubados por 1 h. Após o período de incubação as células foram lavadas 3x com PBS por 10 min e montadas para observação com o meio de montagem vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories – H-1.200). A especificidade da marcação foi feita usando isotipo controle no lugar dos anticorpos primários e/ou com o anticorpo secundário sozinho.

#### 4.8 Marcação de Mitocôndrias:

Para a visualização das mitocôndrias utilizamos a sonda *MitoTracker Red CMXRos* (Molecular Probes, M7512). Esta sonda se difunde passivamente através da membrana plasmática e se acumulam nas mitocôndrias ativas. Plaqueamos  $0,1 \times 10^5$  macrófagos/poço em LabTek (Thermo Fisher Scientific, 155380) de 8 poços com fundo de lamínula o que permite visualizar a marcação nas células vivas através do microscópio confocal invertido. Após o tempo de estímulo as células foram encubadas com 25nM da solução de MitoTracker Red CMXRos em meio RPMI sem soro (o soro contém oxidases que interferem no ensaio) a 37°C na estufa em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 30 min. Após a marcação, as células foram lavadas com meio RPMI aquecido a 37°C e avaliados por microscopia confocal (excitação/emissão - 579/599nm).

#### 4.9 Avaliação de ROS total:

**Dihidroetídio (DHE):** As células foram cultivadas em suspensão em tubos de não aderência (BD Falcon, 149592A), na concentração  $1 \times 10^6$  macrófagos/tubo. Após o tempo de estímulo, as células foram incubadas com  $12,5 \mu\text{M}$  de DHE (Molecular Probes – D1168), adicionadas diretamente ao meio de cultura, por 30 min na estufa em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , protegidas da luz. Após este período as células foram lavadas 3x com HBSS e analisadas por citometria de fluxo.

**CellROX Green:** As células foram cultivadas em suspensão em tubos de não aderência (BD Falcon, 149592A), na concentração de  $1 \times 10^6$  macrófagos/tubo. Após o tempo de estímulo, as células foram incubadas com  $2,5 \mu\text{M}$  de *CellRox Green* (Molecular probes, C10444) por 30 min na estufa em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , protegidas da luz. Após este período, as células foram lavadas 3x com HBSS e analisadas por citometria de fluxo.

#### 4.10 Avaliação de ROS mitocondrial:

**MitoSox red:** A produção de ROS foi avaliada através da sonda MitoSox red (Molecular Probes, M36008). Após o tempo de estímulo, as células foram lavadas em HBSS/ $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  e neste mesmo tampão foram incubadas com  $5 \mu\text{M}$  (citometria) ou  $0,5 \mu\text{M}$  (microscopia confocal) de MitoSox Red por 30 min na estufa em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , protegido da luz. Para a avaliação do tempo de 30 min a sonda foi adicionada às células juntamente com os estímulos. Posteriormente as células foram lavadas em tampão HBSS/ $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  a  $37^\circ\text{C}$  e analisadas. Para citometria de fluxo, as células foram cultivadas em suspensão em tubos de não aderência (BD Falcon), na concentração de  $1 \times 10^6$  macrófagos/tubo. Já para as análises por microscopia confocal  $0,1 \times 10^5$  macrófagos/poço foram plaqueados em lâminas de cultura LabTek (Thermo Fisher Scientific, 155380) de 8 poços.

#### 4.11 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial:

Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial, utilizou-se a sonda éster de tetrametilrodamina (TMRE) (Sigma-Aldrich, 87917). Após o tempo de estímulo, as células foram lavadas em HBSS/ $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$  e neste mesmo tampão foram incubadas

com 100nM de TMRE por 10 min na estufa em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, protegido da luz. Posteriormente, as células foram lavadas em tampão HBSS/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> a 37°C e analisadas por citometria de fluxo.

#### **4.12 Avaliação da peroxidação de lipídios**

Utilizou-se o *Kit Image-iT® Lipid Peroxidation* (Molecular Probes, C10445) que se baseia na capacidade da sonda Bodipy C11 581/591 sofrer oxidação após ação de ROS resultando em espectros de emissão distintos entre a sonda em seu estado reduzido (590nm – vermelho) e oxidado (510nm – verde). A sonda (10µM) foi adicionada a cultura simultaneamente aos estímulos e permaneceu durante todo o tempo do experimento. Após este tempo, as células foram lavadas três vezes com PBS a 37°C. Como controle positivo, 2h antes do final do estímulo, adicionamos hidroperóxido de Cumene (100µM). Para estes ensaios, as células foram cultivadas em LabTek (Thermo Fisher Scientific, 155380) com fundo de lamínula e avaliadas por microscópio confocal

#### **4.13 Avaliação da peroxidação de proteínas dos CLs:**

Utilizou-se o *Kit Click-iT® Lipid Peroxidation Detection* (Molecular probes, C10446) que detecta modificações protéicas decorrentes da ação de lipídios peroxidados. Neste ensaio adicionamos a cultura, simultaneamente aos estímulos, 25 µM do reagente LAA (*Linoleamide Alkyne*) um análogo do ácido linoléico. O LAA incorpora primariamente nas membranas celulares e após sofrer peroxidação produz os ácidos 9 e 13-hidroperoxi-octadecadienóico (HPODE) que posteriormente se decompõe em aldeídos α,β insaturados. Estes subprodutos da peroxidação lipídica reagem prontamente com as cadeias laterais nucleofílicas das proteínas e estas proteínas modificadas são então detectadas. Após o tempo de estímulo, fixamos as células em formalina 3% por 20 min, lavadas 3x com PBS e depois permeabilizadas com 0,05% de Triton® X-100 durante 10 min. As células foram então bloqueadas com BSA a 1% durante 30 min. As células foram lavadas com PBS e a reação de Click foi realizada incubando as células com o coquetel de reagentes fornecidos pelo fabricante contendo 5µM de Alexa 488 Fluor® azida durante 30 min.

#### **4.14 Isolamento de CLs:**

Após a diferenciação,  $20 \times 10^6$  macrófagos foram cultivados em garrafas de cultura de  $175 \text{cm}^2$ . Após o tempo dos estímulos as células foram lavadas com PBS e ressuspensas com auxílio de *cell scraper*. Posteriormente, a suspensão celular foi centrifugada e novamente ressuspensa em tampão TEE-KCl (Tris 20nM, EDTA 1mM, EGTA 1mM e KCl 0,1mM – pH 7.4). A suspensão celular foi cavitada em nitrogênio (700 psi) em presença do coquetel inibidor de protease e fosfatase (complete protease inhibitor cocktail- Roche), por 15 min no gelo. Em seguida as células cavitadas foram adicionadas a um gradiente de sacarose (1,08 M, 0,27 M e 0,135 M) e submetidas à ultracentrifugação ( $150.000 \times g$  por 80 min) (Brasaemle, Dolios et al. 2004). A ultracentrifugação gerou sete frações subcelulares sendo a primeira e a segunda ricas em CLs. Como controle do fracionamento celular, utilizou-se a mensuração da atividade da enzima citoplasmática lactato desidrogenase – LDH (Promega, G1780), que nos experimentos realizados não apresentaram atividade nas primeiras e segundas frações do gradiente.

#### **4.15 Dosagem de lactato**

Para dosagem de lactato no sobrenadante das culturas utilizou-se o Kit labtest lactato enzimático (Labtest, 138). Este ensaio baseia-se na atividade da lactato oxidase sobre o ácido láctico formando piruvato e peróxido de hidrogênio. Este último através de uma reação de acoplamento com 4-aminoantipirina e TOOS (N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-toluidina) produz uma quinoneimina que tem absorvância máxima em 550nm, mensurada por espectrofotometria.

#### **4.16 Dosagem de 8-Isoprostano (Ensaio Imuno enzimático – EIA)**

Os níveis de 8-Isoprostano foram dosados diretamente dos sobrenadantes da cultura celular, do sobrenadante do lavado peritoneal ou da fração de CLs isolada por ultracentrifugação em gradiente de sacarose. Neste último caso, para liberar o 8-isoprostano esterificado realizou-se uma reação de hidrólise em solução de KOH 15%, conforme especificado pelo fabricante (Cayman Chemical, 516351). Às amostras que não foram dosadas de imediato foi adicionado BHT 0,005% e

armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$ . Foram adicionados à placa de 96 poços revestida com de anticorpo de coelho contra-IgG de camundongo 50 $\mu\text{l}$  das amostras diluídas previamente no *EIA buffer* ou 50 $\mu\text{l}$  de 8-isoprostano na curva padrão (500, 200, 80, 32, 12,8, 5,1, 2,0, 0,8 pg/mL diluídos em *EIA buffer*). O anticorpo contra-8-isoprostano (50 $\mu\text{l}$ ) e o 8-isoprostano conjugado com colinesterase também foram adicionadas aos poços e incubados por cerca de 16h. O poço do controle negativo, ou branco permaneceu vazio por este período. Após esta etapa a placa foi lavada (5x) com tampão de lavagem (*wash buffer*) contendo Tween 20 a 0,05%, seguido pela adição de 200 $\mu\text{L}$  do reagente de Elmans por poço. Este reagente contém o substrato da enzima colinesterase diluído em água MiliQ (segundo instruções do fabricante) para a revelação da reação. O produto da reação apresenta coloração amarelada e tem absorvância a 405nm determinada espectrofotometricamente, proporcional a quantidade de 8-isoprostano conjugado a colinesterase ligada à placa, o qual é inversamente proporcional a quantidade de 8-isoprostano livre presente no poço durante a incubação.

#### **4.17 Western blotting**

As células foram lisadas em tampão de lise (PMSF, leupeptina,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  e NaF) contendo inibidores de protease e fosfatase, seguido de centrifugação por 15 min a 14000 rpm. Aos sobrenadantes, contendo as proteínas alvo, foram adicionados tampão de amostra e a solução resultante submetida a aquecimento (5 min à  $100^{\circ}\text{C}$ ). As proteínas obtidas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose em um sistema de *blotting* (BIO-RAD, Hercules, CA). A membrana foi bloqueada em tampão de bloqueio (5 % BSA) por 1h; submetida a lavagens com tampão Tris salina contendo 0,5% de tween 20 (TBS-T) e incubadas, sob agitação 16h à  $4^{\circ}\text{C}$  com o anticorpo primário contra ADRP (Fitzgerald, 20R-AP002) e contra  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778). Após o período de incubação, as membranas foram lavadas por 3x com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology) por 1h, sob agitação, à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas por 3x com TBS-T e as bandas foram reveladas utilizando-se kit de detecção (ECL Plus Western Blotting detection system) e filmes fotográficos imersos em solução reveladora e fixadora.

#### **4.18 Microscopia eletrônica**

As amostras de fígado e lavado peritoneal de animais dos grupos SHAM e CLP (grupo séptico) foram coletadas e imediatamente fixadas em solução de tampão fosfato 0,1M contendo 1% de paraformaldeído e 1% de glutaraldeído, pH 7.3, por 4h à temperatura ambiente (Melo e cols., 2006) e lavados no mesmo tampão. As amostras foram pós-fixadas em mistura de tampão fosfato contendo 1% de tetróxido de ósmio e 1.5% de ferricianeto de potássio, por 1h antes da desidratação em série gradual de etanol. Posteriormente foram infiltrados e incluídos em óxido de propileno- Epon (PolyBed 812, Polysciences, Warrington, PA, USA). Após a polimerização a 60°C por 16h, cortes ultrafinos foram feitos utilizando navalha de diamante em ultramicrotomo. (Sorvall MT2, Newton, MA, USA) e recolhidas em grades de 200 mesh (Ted Pella, Redding, CA, USA) antes da contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram analisadas em microscópio de transmissão (EM 10, Zeiss, Germany) (CAPI – centro de aquisição e processamento de imagem, UFMG) a 60KV e JEOL- JEM-1011 (plataforma de microscopia eletrônica Rudolf Barth) a 80 KV.

#### **4.19 Análises por microscopia confocal:**

As lâminas foram analisadas ao microscópio confocal Olympus (Japan) Fluoview FV1000 em conjunto com o programa FV10-ASW 4.1.

#### **4.20 Análises por citometria de fluxo:**

A aquisição das amostras foi feita no citômetro FACS Calibur utilizando o programa *Cell Quest* e analisadas utilizando o *software FlowJo V10*.

#### **4.21 Análises estatísticas:**

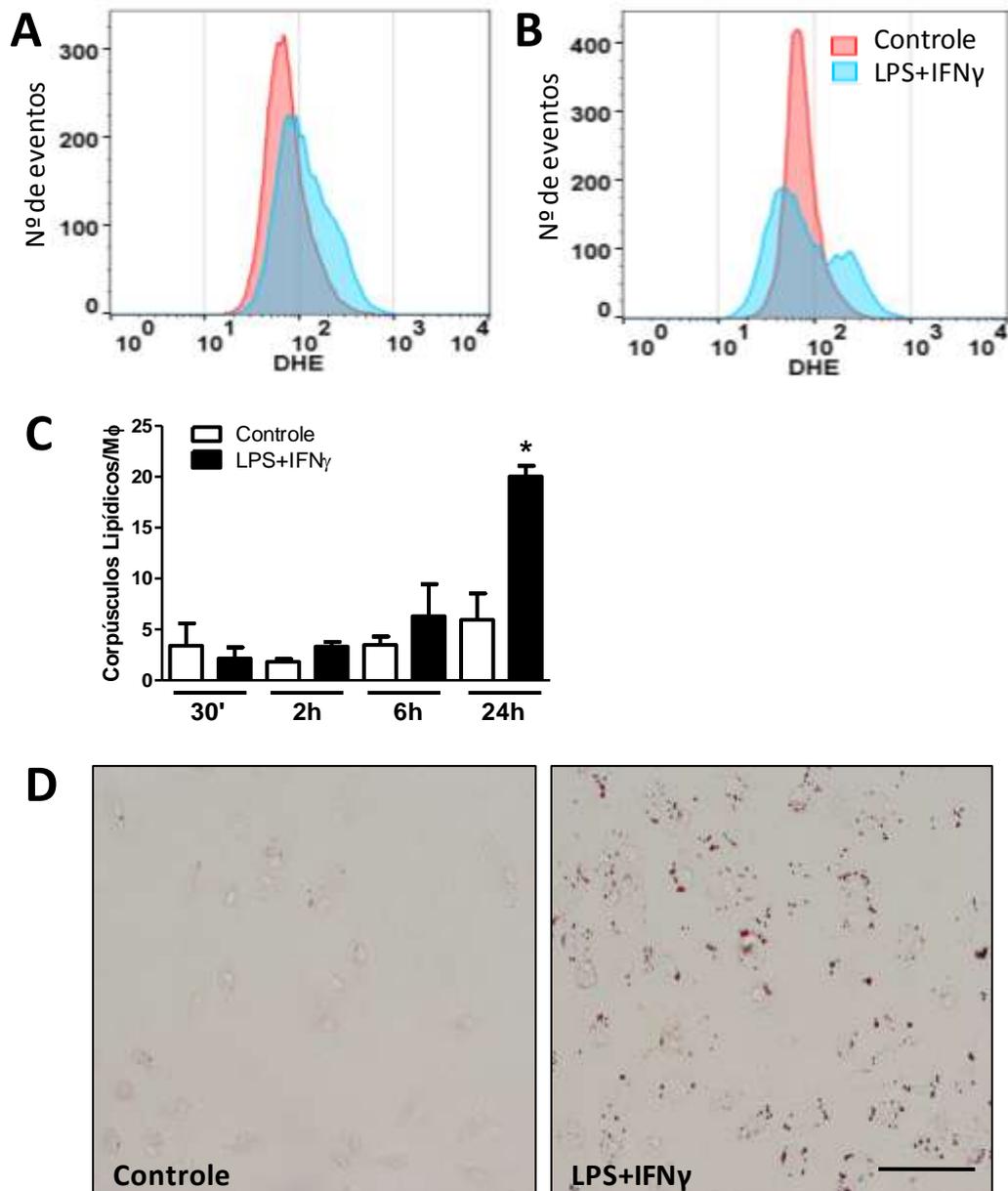
Os dados obtidos neste estudo foram apresentados na forma de média±erro padrão da média e comparados pela análise de variância (ANOVA). No caso de interação significativa, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni (salvo exceções indicadas nas legendas das figuras). Para todas as análises foi adotado como nível de significância  $p \leq 0,05$ .

## 5 Resultados:

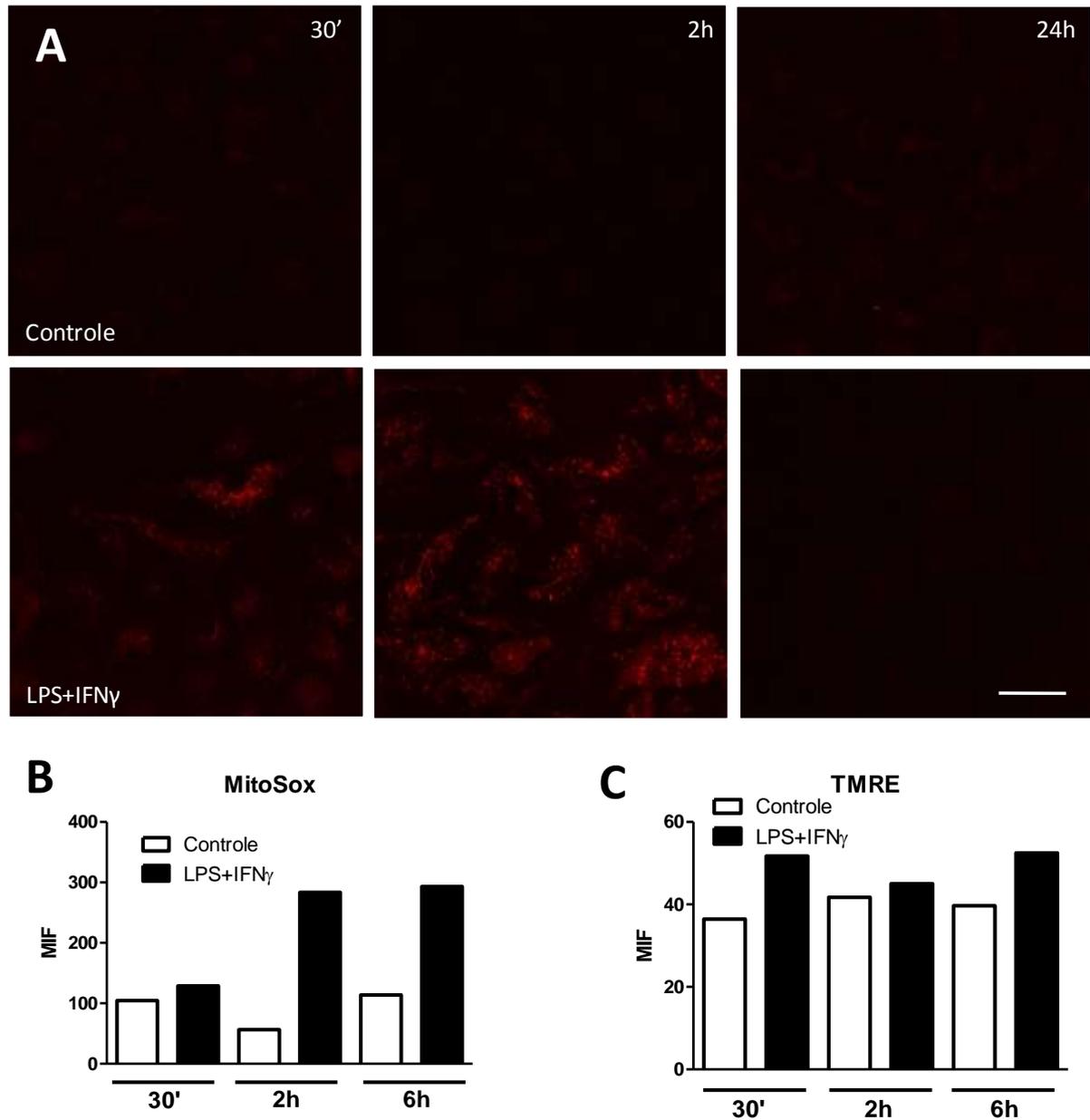
### 5.1 Estímulo com LPS + IFN $\gamma$ induz aumento na produção de ROS e a biogênese de CLs

Para estudar a dinâmica de produção de ROS total e da formação de CL, utilizamos macrófagos diferenciados a partir de precursores da medula óssea, e estimulamos com LPS + IFN $\gamma$ . Por citometria de fluxo, utilizando a sonda DHE, observamos que o aumento na produção de ROS ocorre precocemente, já podendo ser detectado a partir de 30 min de estímulo (Figuras 5 A, B). O aumento da produção de ROS precede temporalmente o aumento da formação de CLs. Em nossos ensaios de cinética da biogênese de CLs observamos que a formação de CLs se deu em tempos mais tardios, sendo significativo após 24h de estímulo (Figuras 5 C, D).

Para avaliar se o estímulo com LPS + IFN $\gamma$  induz o aumento na produção de ROS de origem mitocondrial utilizamos a sonda MitoSox por microscopia confocal (Figura 6 A) e por citometria de fluxo (Figura 6 B). Esta sonda é permeável a membranas de células vivas e, como mostram nossos resultados de microscopia confocal, é seletivamente direcionada para as mitocôndrias devido a sua natureza catiônica. Uma vez na mitocôndria o MitoSOX Red é oxidado pela exposição aos íons superóxidos produzindo o intermediário fluorescente 2-OH-Mito-E<sup>+</sup> (2-hidroxi-mito-etidio) que fluoresce em vermelho (excitação/emissão - 510/580 nm). Nossos resultados sugerem aumento na produção de ROS mitocondrial após 30 min de estímulo com LPS + IFN $\gamma$ , e de maneira mais pronunciada após 2h. Este aumento na produção de ROS mitocondrial não parece ser acompanhado por alterações no potencial de membrana mitocondrial avaliado através da sonda catiônica TMRE nos tempos analisados (Figura 6 C), embora o N amostral ainda seja pequeno.



**Figura 5: Dinâmica de produção de ROS total e da formação de CLs em macrófagos estimulados com LPS+IFN $\gamma$ :** (A, B) Histogramas representativo da intensidade de fluorescência de DHE após o estímulo com 500ng/mL LPS + 10ng/mL IFN $\gamma$ . (A) após 30 min de estímulo e (B) após 24h (N=5). (C) cinética de formação de CLs após estímulo com LPS+IFN $\gamma$ . Cada barra representa a média  $\pm$  EMP do número de CLs presentes em 50 células contadas consecutivamente. Para análise estatística foi realizado ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ . As diferenças em relação ao respectivo grupo controle são indicadas pelo (\*), N=3. (D) Imagem obtida por microscopia de campo claro de macrófagos corados com ORO 24h após o estímulo evidenciando o aumento no número de CLs em comparação ao grupo controle. Barra de escala - 50 $\mu$ m.

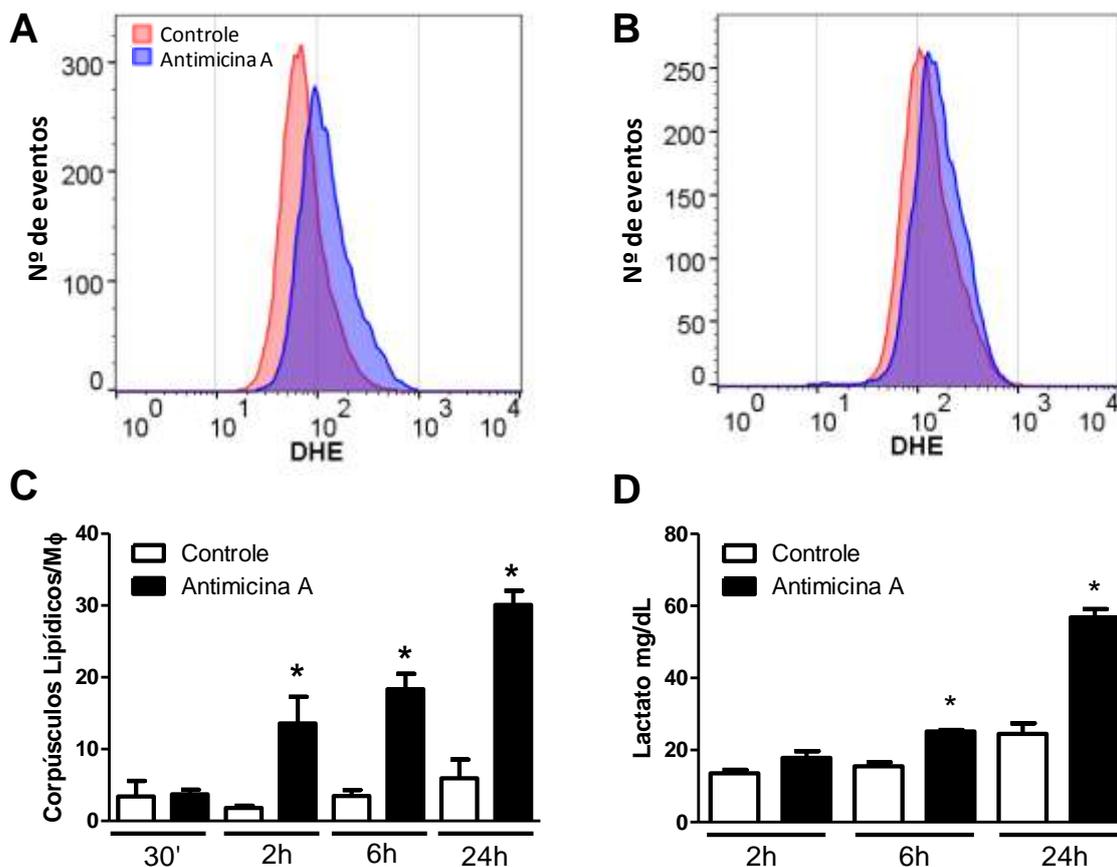


**Figura 6: Dinâmica de produção de ROS mitocondrial em macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$ .** (A) Imagens de microscopia confocal de macrófagos estimulados ou não por 30min, 2h e 24h. Barra de escala - 20 $\mu$ m. (N=2). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência (MIF) das marcações com MitoSox red e (C) TMRE nas células estimuladas ou não com LPS+IFN $\gamma$  ao longo do tempo (N=1).

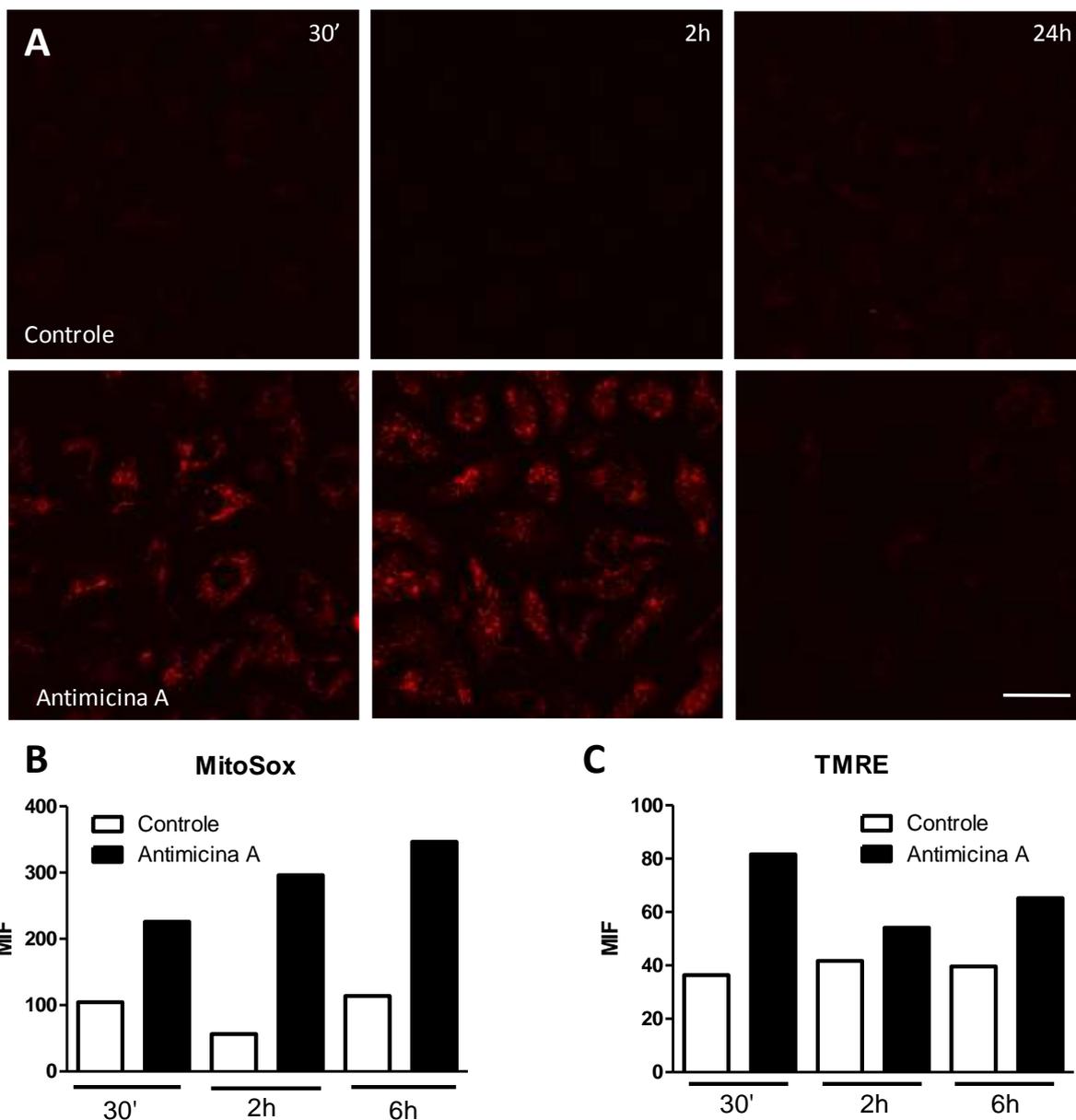
## 5.2 Disfunção mitocondrial é capaz de induzir a biogênese de CLs

A antimicina A é uma droga inibidora do complexo III da cadeia transportadora de elétrons e por isso é uma potente indutora de disfunção mitocondrial. Para avaliar se a indução da disfunção mitocondrial é capaz de induzir a biogênese de CLs, tratamos macrófagos diferenciados de medula óssea com 1µg/mL de antimicina A e avaliamos a produção de ROS total por citometria de fluxo utilizando a sonda DHE e a formação de CLs pela coloração de ORO. A antimicina A induz em tempos bem precoces o aumento na produção de ROS total, podendo ser observado após 30 min de tratamento (Figura 7 A) e, de maneira mais sutil, após 24h (Figura 7 B). A antimicina A mostrou-se ser um potente indutor de CLs, sendo o aumento em relação ao controle significativo já após 2h de tratamento, e com médias superiores ao estímulo com LPS+IFN $\gamma$  (Figura 7 C). Realizamos a dosagem de lactato como controle do bloqueio da cadeia transportadora de elétrons. Este bloqueio resultou em um aumento progressivo nos níveis de lactato, indicando o processo de fermentação láctica por estas células (Figura 7 D).

Com o bloqueio da cadeia transportadora de elétron pela antimicina A é de se esperar que boa parte do ROS total produzido seja oriundo do desacoplamento das mitocôndrias. Para confirmar essa hipótese utilizamos a sonda MitoSox também nas células tratadas com 1µg/mL de antimicina A (Figura 8 A, B). O tratamento com antimicina A induziu grandes quantidades de ROS mitocondrial e de maneira mais precoce na curva temporal se comparadas com as células estimuladas com LPS + IFN $\gamma$ . A medida do potencial de membrana mitocondrial por TMRE sugere uma hiperpolarização inicial (Figura 8 C), mas serão necessários mais experimentos para confirmar o resultado.



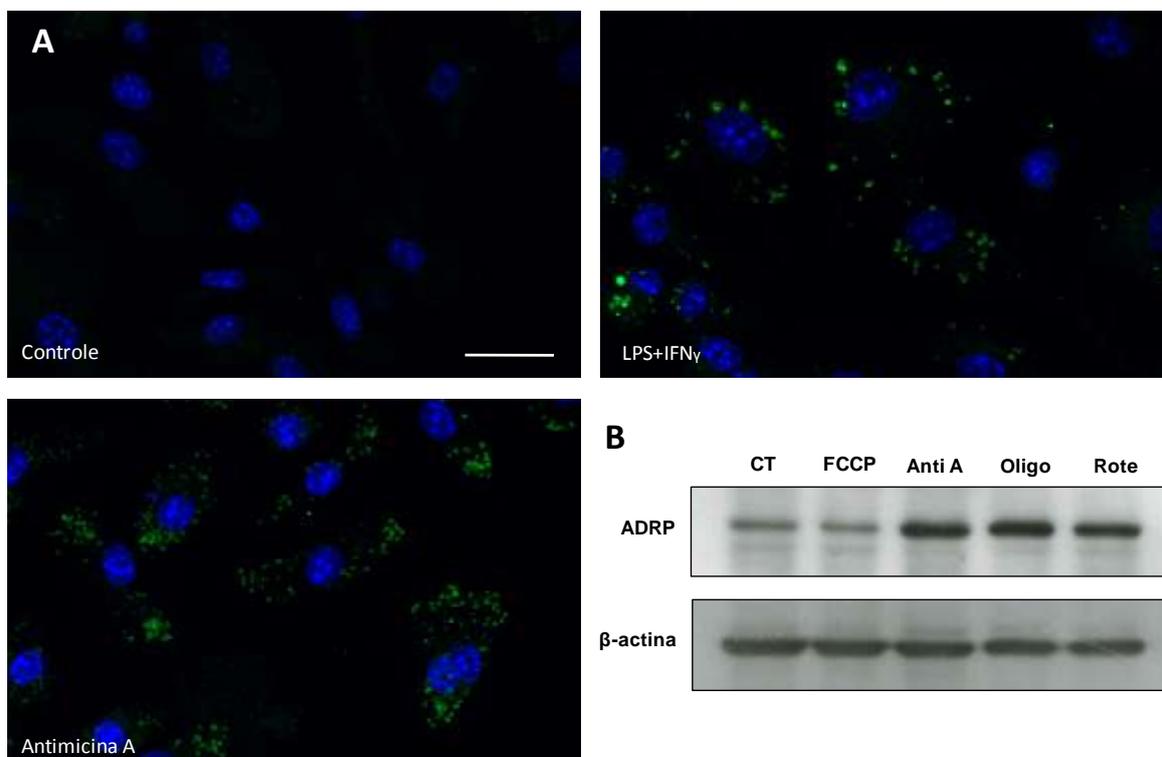
**Figura 7: Dinâmica de produção de ROS total e da formação de CLs em macrófagos tratados com antimicina A:** (A, B) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência de DHE após o tratamento com antimicina A (1µg/mL) por (A) 30 min e (B) 24h (N=5). (C) Cinética de formação de CLs após o tratamento com antimicina A. Cada barra representa a média ± EMP do número de CLs presentes em 50 células contadas consecutivamente em microscópio de campo claro. Para análise estatística foi realizado ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ . As diferenças em relação ao respectivo grupo controle são indicadas pelo (\*), N=3. (D) dosagem de lactado presente nos sobrenadantes de culturas de macrófagos tratadas com antimicina A.



**Figura 8: Dinâmica de produção de ROS mitocondrial em macrófagos tratados com antimicina A.** (A) Imagens de microscopia confocal de macrófagos tratados ou não com antimicina A por 30min, 2h e 24h. Barra de escala - 20 $\mu$ m. (N=2). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência (MIF) das marcações com *MitoSox red* e (C) TMRE nas células tratadas ou não com antimicina A ao longo do tempo (N=1).

### **5.3 Macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$ ou antimicina A, *in vitro*, apresentam aumento na expressão de proteína estrutural dos CLs.**

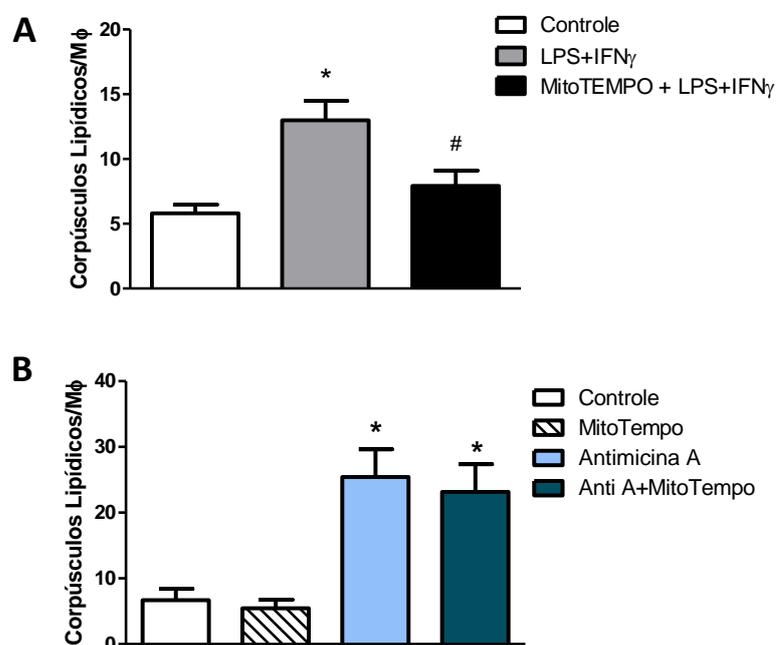
CLs compartimentalizam um conteúdo protéico variado, entretanto uma família de proteínas se destaca pelo papel fundamental na estrutura destas organelas, trata-se da família PAT. A família PAT inclui a perilipina, proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos (ADRP) e TIP 47 (tail-interacting protein of 47 kDa) as quais se localizam na superfície dos CLs. Em consonância com o aumento no número de CLs, macrófagos estimulados com LPS+IFN $\gamma$  ou tratados com antimicina A também induzem aumento na expressão de ADRP (Figura 9 A). O aumento da expressão de ADRP nas células tratadas com antimicina A não é devido a um efeito inespecífico da droga, mas sim a sua atuação nas mitocôndrias, uma vez que a rotenona, droga inibidora do complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons, e a oligomicina A, inibidora da ATP sintase, também induzem aumento na expressão de ADRP (Figura 9 B). As três drogas tendem a diminuir o fluxo de elétrons pela cadeia transportadora favorecendo a produção de ROS. Já o tratamento com o ionóforo de prótons FCCP, que tende a aumentar o fluxo de elétrons pela cadeia prevenindo o vazamento de elétrons, não induz nenhum aumento na expressão de ADRP.



**Figura 9: Expressão de ADRP em macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$  ou tratados com drogas que atuam em diferentes componentes mitocondriais.** (A) Imunomarcação e microscopia confocal da proteína ADRP em macrófagos estimulados com LPS+IFN $\gamma$  ou tratados com antimicina A por 24h. Por ser uma proteína localizada na periferia dos CLs, a marcação de ADRP pode ser vista no formato de pequenos anéis marcados em verde, e o núcleo dos macrófagos em azul (DAPI). Barra de escala - 20 $\mu$ m. (B) *Western blotting* para identificação das proteínas ADRP e  $\beta$ -actina (controle de carregamento) em amostras de macrófagos tratados com antimicina A (1 $\mu$ g/mL), rotenona (1 $\mu$ g/mL), oligomicina A (2 $\mu$ g/mL) e FCCP (1 $\mu$ M) por 24h.

#### 5.4 A biogênese de CLs induzido por LPS + IFN $\gamma$ é dependente de ROS de origem mitocondrial

Tendo em vista que a disfunção mitocondrial é capaz de induzir formação de CLs, como observado nas culturas tratadas com antimicina A, resolvemos avaliar então o papel da ROS mitocondrial na biogênese de CLs. Para isso pré-tratamos as células com o antioxidante específico para superóxidos mitocondriais Mito-TEMPO 1h antes dos estímulos com LPS+IFN $\gamma$  ou tratamento com antimicina A, permanecendo o antioxidante por todo período de estimulação (24h). O pré-tratamento com Mito-TEMPO reduziu significativamente o número de CLs induzidos pelo estímulo com LPS + IFN $\gamma$  (Figura 10 A), mas na concentração utilizada (100 $\mu$ M), não reduziu a biogênese de CLs induzidos pelo tratamento com antimicina A (Figura 10 B).



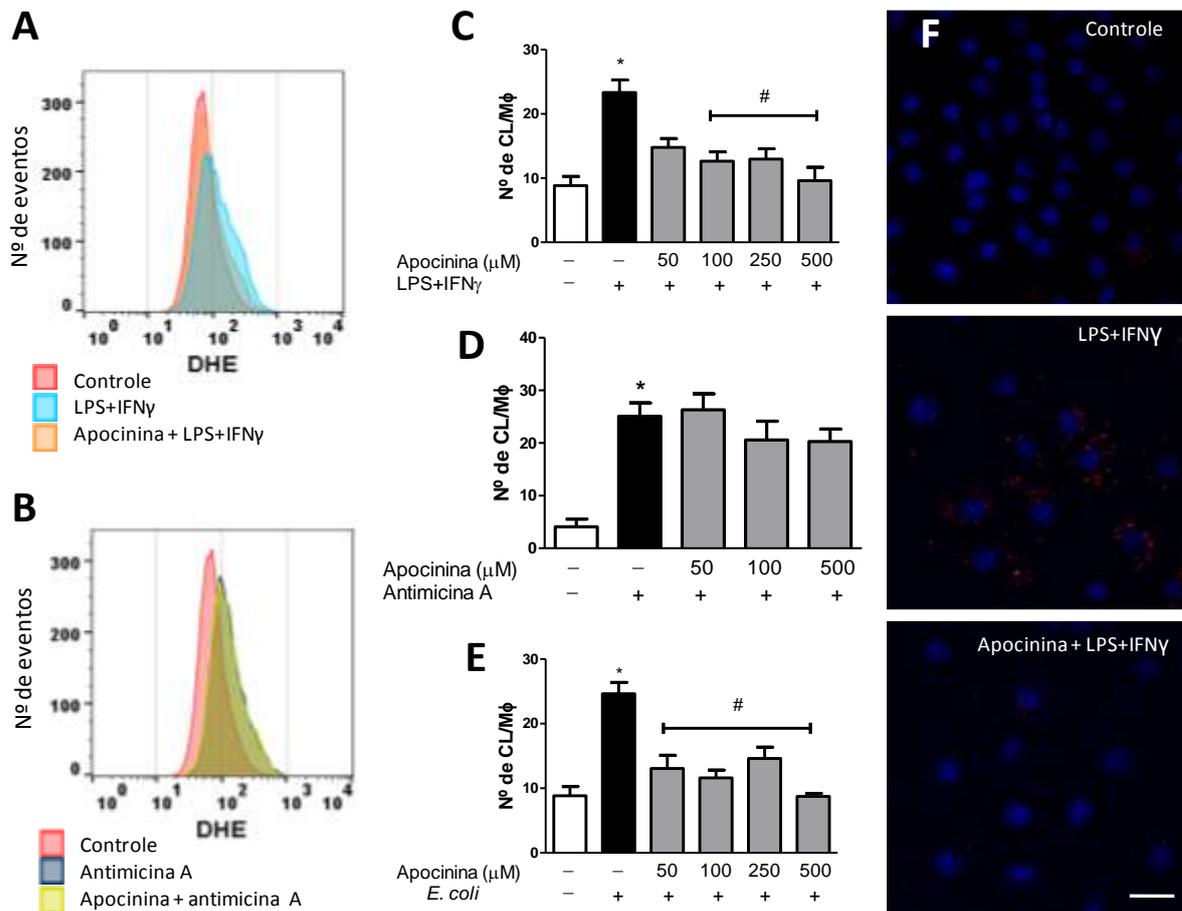
**Figura 10: Diminuição do número de CLs induzidos por LPS + IFN $\gamma$  após pré-tratamento com Mito-TEMPO.** Macrófagos diferenciados de medula óssea foram pré-tratados com 100 $\mu$ M de Mito-TEMPO 1h antes do estímulo ou não LPS+IFN $\gamma$  ou tratamento com antimicina A, por 24h. (A) gráfico da média do número de CLs nas culturas estimuladas com LPS+IFN $\gamma$  e (B) tratadas com antimicina A. Cada barra representa a média  $\pm$  EMP de 50 células contadas consecutivamente em microscópio de campo claro. Para análise estatística foi realizado ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ ,  $N=3$ . As diferenças em relação aos respectivos grupos controle são indicadas pelo (\*) e em relação ao grupo estimulado com LPS+IFN $\gamma$  indicadas pelo (#).

## 5.5 A biogênese de CLs induzido por LPS + IFN $\gamma$ é dependente da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase

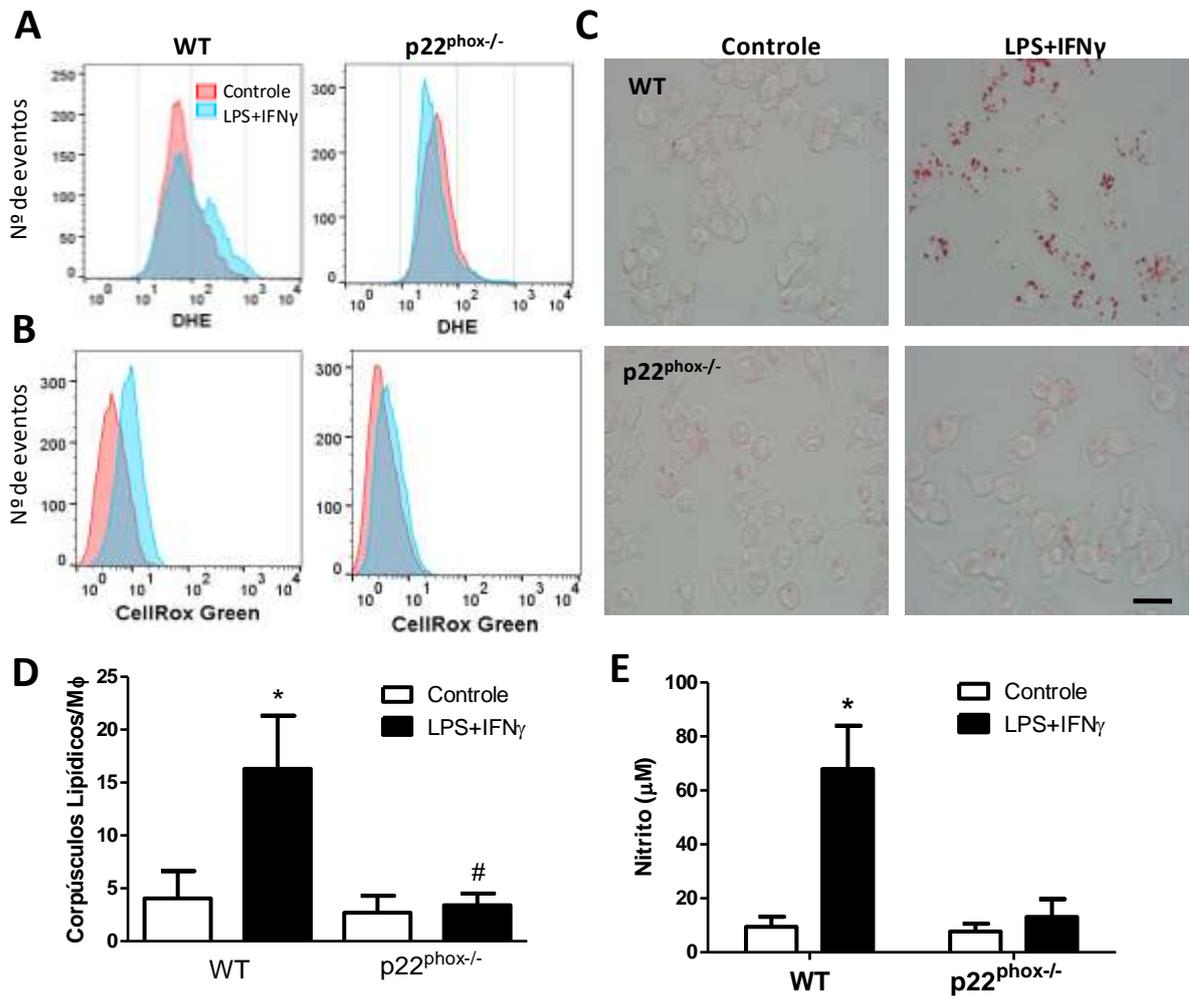
Apocinina tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta farmacológica para inibir a atividade da enzima NADPH oxidase. Seu mecanismo de ação envolve bloquear a translocação da subunidade citosólica p47phox para a membrana plasmática, inibindo assim a ativação do complexo Nox (principalmente NOX1 e NOX2). Em nosso modelo *in vitro*, macrófagos diferenciados da medula óssea foram pré-tratados com apocinina (500 $\mu$ M) e estimulados com LPS + IFN $\gamma$  ou *E. coli* (MOI 5:1), ou ainda tratados com antimicina A (1 $\mu$ g/mL). Por citometria de fluxo, confirmamos que o pré-tratamento dos macrófagos com apocinina reduza oxidação da sonda DHE induzida pelo LPS+IFN $\gamma$  já após 30 min de estímulo, como esperado visto que a principal fonte de ROS nesta condição vem da ativação da NADPH oxidase (Figura 11 A). Por sua vez, o pré-tratamento com apocinina não reduziu o aumento de ROS induzidos pela antimicina A, cuja principal fonte de ROS é de origem mitocondrial (Figura 11 B). Após 24h de estímulo observamos que a inibição farmacológica da NADPH oxidase pela apocinina reduziu significativamente a biogênese de CLs induzidos pela estimulação com LPS+ IFN $\gamma$  (Figuras 11 C, F) ou *E. coli* (Figura 11 E), mas não aqueles induzidos pelo tratamento com a antimicina A (Figura 11 D).

Para confirmar a participação da NADPH oxidase na biogênese de CLs estimulados por LPS + IFN $\gamma$  nós geramos clones de macrófagos deficientes na proteína p22<sup>phox</sup>, subunidade transmembrana integrante dos complexos NOX1-4, utilizando a técnica de edição gênica conhecida como CRISPR/Cas9. Esta técnica se baseia na capacidade da nuclease Cas9 ser guiada por pequenos RNAs, crRNA (CRISPR RNA) e tracrRNA (trans-activating crRNA), a alvos específicos dentro do genoma, e estimular a quebra da dupla-fita do DNA. (Jinek et al., 2012; Ran et al., 2013). Utilizamos uma sequência guia direcionada ao éxon 3 do gene que codifica a proteína p22<sup>phox</sup> (TGTCTGCTGGAGTATCCCCG), avaliada como um guia de alta qualidade (score 87). A utilização desta ferramenta nos permitiu gerar clones de macrófagos murinos que apresentavam uma deleção de cerca de 20 nucleotídeos no éxon 3 do gene da p22<sup>phox</sup> o que resultou na ausência da expressão desta proteína confirmada por western blotting (dado não mostrado). Utilizando as sondas para mensurar ROS total CellRox green (Figura 12 A) e DHE (Figura 12 B) observamos que as células p22<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> produzem menores quantidades de ROS,

quando estimulados com LPS+IFN $\gamma$  por 24h, se comparadas as células WT. Para avaliar a biogênese de CLs novamente utilizamos a coloração de ORO (Figura 12 C) e quantificamos os CLs nas células após 24h de estímulo com LPS+IFN $\gamma$  (Figura 12 D). Em concordância com os resultados obtidos com a apocinina, os clones p22<sup>phox $^{-/-}$</sup>  não apresentaram aumento na formação de CLs quando estimulados com LPS+IFN $\gamma$ , evidenciando mais uma vez um papel de ROS produzidos pela ativação da NADPH oxidase na biogênese destas organelas. Uma vez que muitas vias de sinalização são sensíveis ao estado redox da célula, incluindo a via de produção de óxido nítrico (NO), avaliamos também a produção de nitrito pelo método de Griess (Figura 12 E) no sobrenadante destas culturas. Nossos resultados mostram que os clones p22<sup>phox $^{-/-}$</sup>  apresentaram capacidade reduzida de produção de NO quando estimulados com LPS + IFN $\gamma$  em comparação com as células WT.



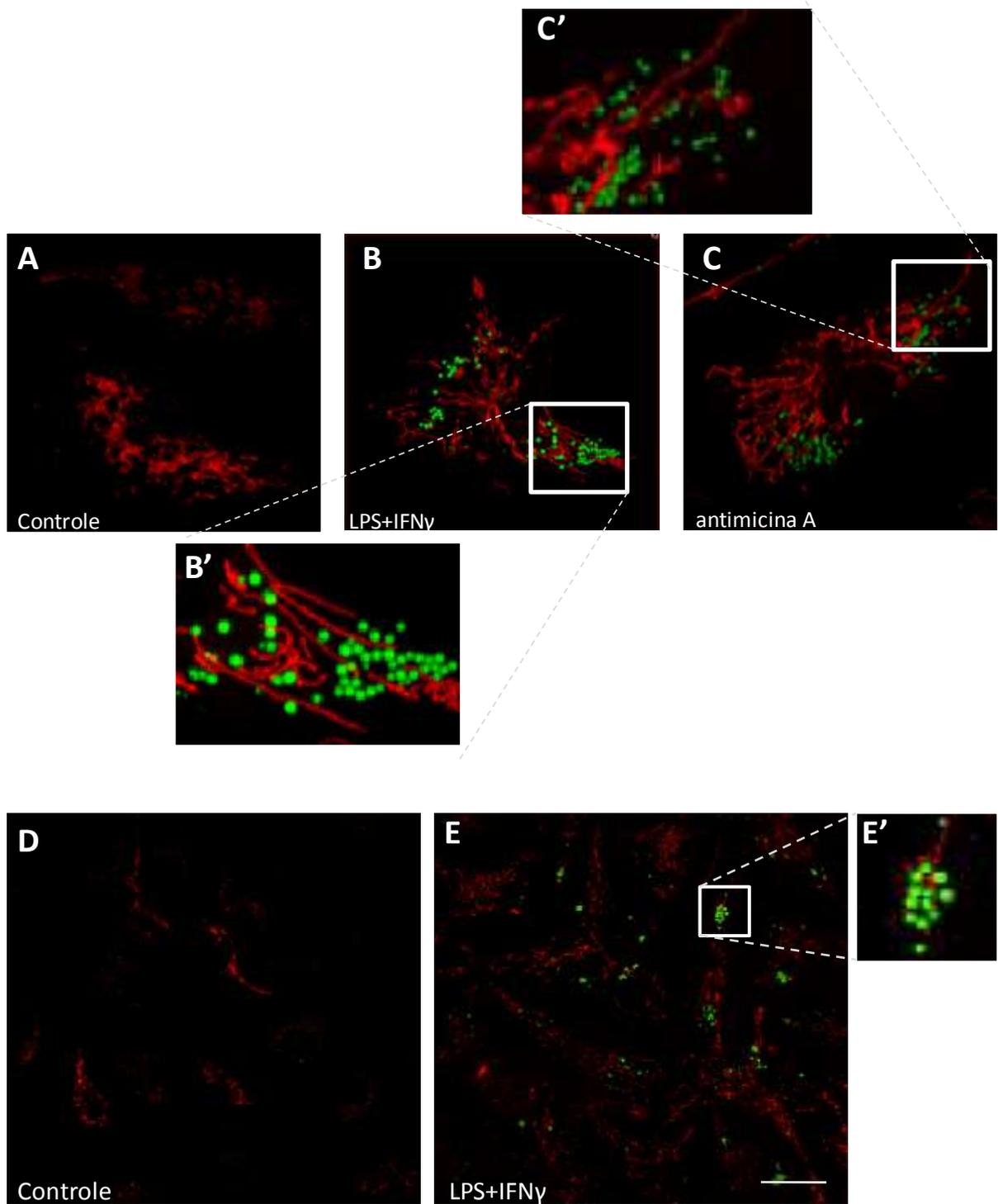
**Figura 11: Efeito do pré-tratamento com apocinina sobre a biogênese de CLs induzida pelos estímulos com LPS+IFN $\gamma$ , *E. coli* e antimicina A.** Macrófagos derivados de medula óssea foram pré-tratados com apocinina (500 $\mu$ M) 1h antes dos estímulos com LPS+IFN $\gamma$ , ou *E. coli* (MOI 5:1) ou antimicina A. A apocinina permaneceu por todo o tempo de estímulo. (A,B) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência de DHE em macrófagos pré-tratados com apocinina, 30 min após o tratamento estímulo com (A) LPS+IFN $\gamma$  ou (B) antimicina A (N=5). (C-E) Gráficos da média do número de CLs induzidos pelo (C) LPS+IFN $\gamma$ , (D) antimicina A e (E) *E. coli*, após 24h, com ou sem o pré-tratamento com apocinina. Cada barra representa a média  $\pm$  EMP do número de CLs presentes em 50 células, coradas com ORO, e contadas consecutivamente em microscópio de campo claro. Para análise estatística foi realizado ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ . As diferenças em relação ao grupo controle são indicadas pelo (\*) e em relação ao grupo estimulado sem apocinina (#), N=3. Em (F) temos imagens de microscopia confocal representativas do que foi quantificado em (C). Barra de escala - 20 $\mu$ m.



**Figura 12: Produção de ROS, NO e biogênese de CLs em clones  $p22^{phox-/-}$  após estímulo com LPS+IFN $\gamma$ .** Macrófagos murinos derivados de medula óssea imortalizados (IBMM) *wild type* ou deficientes na proteína  $p22^{phox}$  foram estimuladas ou não com LPS+IFN $\gamma$  por 24h. (A,B) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência de (A) CellRox green e (B) DHE. (C) Imagens de microscopia de campo claro das células WT e  $p22^{phox-/-}$  coradas com ORO. Barra de escala - 20 $\mu$ m. (D) Gráficos das médias dos números de CLs induzidos por LPS+IFN $\gamma$ . Cada barra representa a média  $\pm$  EMP de 50 células, coradas com ORO, contadas consecutivamente em microscópio de campo claro. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$  verificada pelo teste t não paramétrico seguido do pós-teste de Mann Whitney. O (\*) indica a diferença significativa entre os grupos WT controle e estimulado. O (#) indica a diferença significativa entre o grupo  $p22^{phox-/-}$  estimulado com LPS+IFN $\gamma$  em relação ao grupo WT igualmente estimulado. N=4.

## **5.6 CLs e mitocôndrias se encontram intimamente associados em macrófagos de medula estimulados com LPS+IFN $\gamma$ ou tratados com antimicina A.**

Tendo em vista o aumento significativo do número de CLs induzidos pela disfunção mitocondrial tanto nos grupos LPS + IFN $\gamma$  quanto antimicina A, resolvemos investigar se estas organelas estabelecem interações. Esta interação pode ter implicações no contexto do dano celular, tanto pela possível peroxidação de lipídios encontrado nos CLs mediada pelas espécies reativas de origem mitocondrial, quanto pela indução da disfunção mitocondrial mediada por efeitos lipotóxicos dos lipídios peroxidados presentes nos CLs. Para avaliar esta hipótese utilizamos a sonda fluorescente de lipídios neutros Bodipy 493/503 e a sonda catiônica *Mitotracker CMXRos Red*, que se acumula em mitocôndrias de acordo com seu potencial de membrana mitocondrial. Nas células controle podemos observar a marcação mitocondrial e o número de CLs bastante reduzido (Figura 13 A). Nas células estimuladas com LPS + IFN $\gamma$  (Figura 13 B) ou tratadas com antimicina A (Figura 13 C) observamos que mitocôndrias e CLs se encontram intimamente associados. Ao realizarmos a marcação simultânea dos CLs com a sonda Bodipy 493/503 e de ROS mitocondrial com *MitoSox Red* nas células estimuladas com LPS + IFN $\gamma$  (Figura 13 E, E') percebemos a proximidade que CLs se encontram das espécies reativas produzidas na mitocôndria após este estímulo.

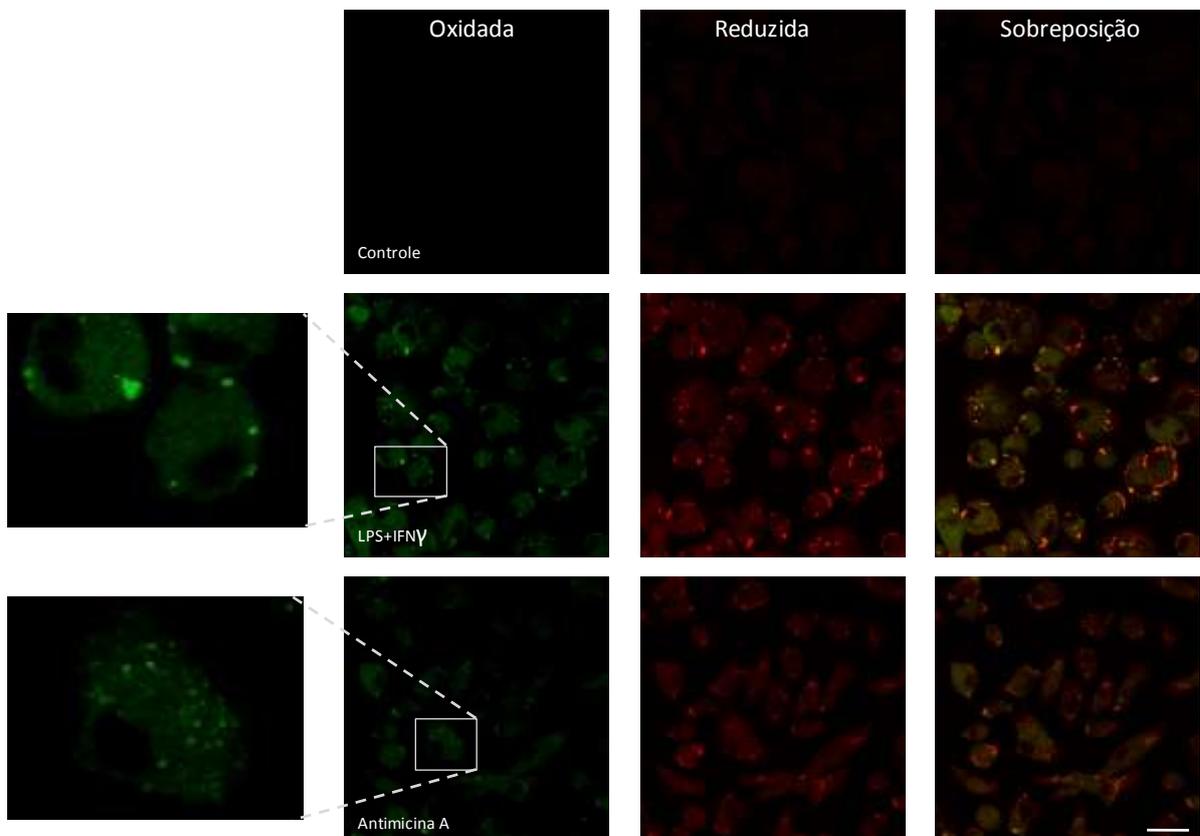


**Figura 13: CLs e mitocôndrias estão intimamente associados em macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$  ou tratados com antimicina A.** As células foram, estimuladas ou não com LPS + IFN $\gamma$  ou tratadas com antimicina A, por 24h. Procedemos às marcações nas células vivas sendo os CLs corados pela sonda de lipídios neutros BODIPY (verde) e as mitocôndrias foram coradas por Mitotracker CMXRos Red (A-C) ou MitoSox (D,E) (vermelho). Barra de escala: 20 $\mu$ m.

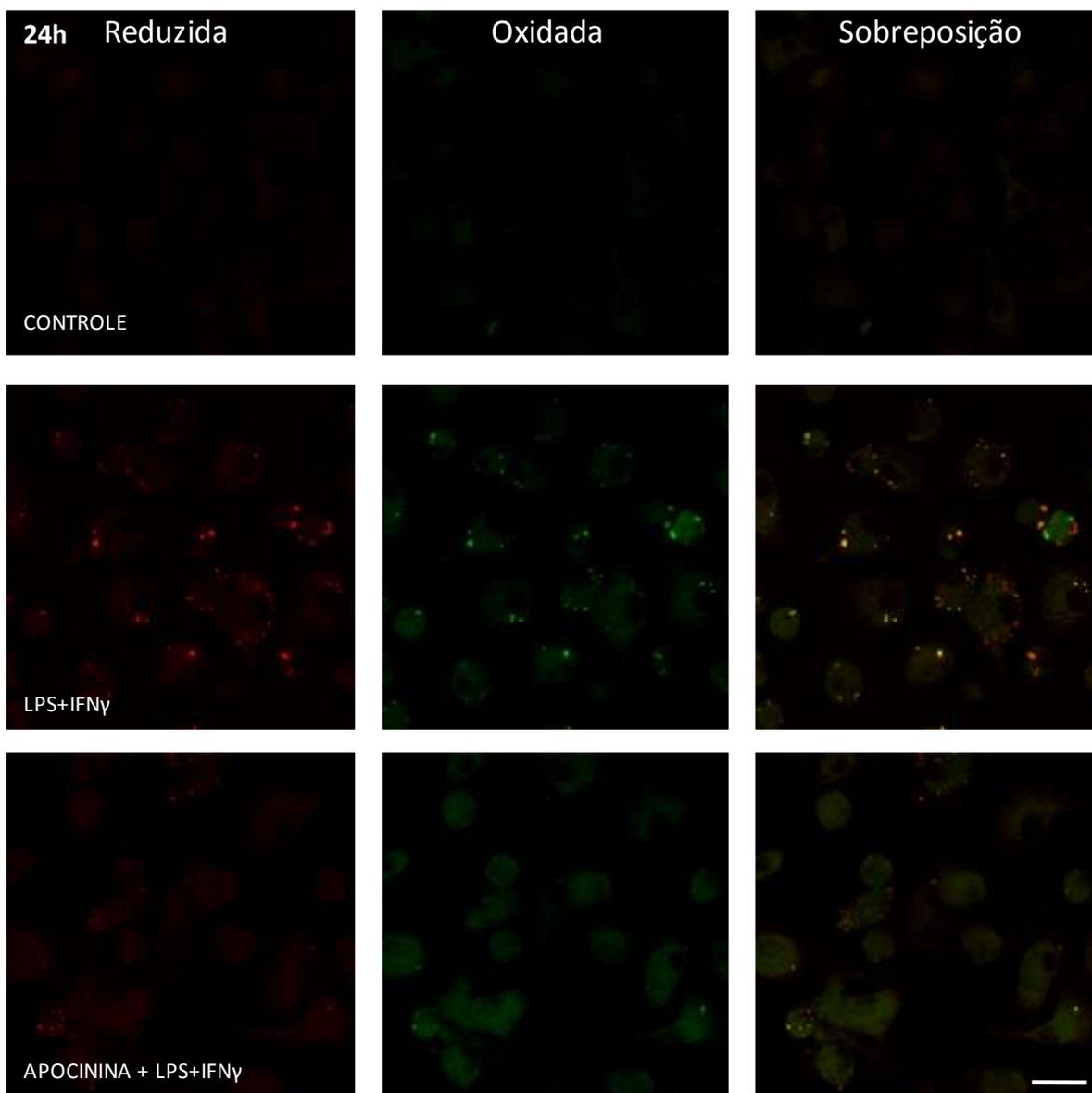
## 5.7 ROS induz a peroxidação de lipídios presentes nos CLs de maneira dependente da ativação de NADPH oxidase

Como demonstrado nos resultados anteriores, grandes quantidades de ROS total e mitocondrial, são gerados pelo estímulo com LPS + IFN $\gamma$  ou tratamento com antimicina A. Haja vista que os lipídios são moléculas altamente susceptíveis a oxidação, buscamos saber se os lipídios presentes nos CLs poderiam sofrer peroxidação. Para tal utilizamos o *Kit Image-iT® Lipid Peroxidation* que se baseia na capacidade da sonda Bodipy C11 581/591 sofrer oxidação após ação de ROS resultando em espectros de emissão distintos entre a sonda em seu estado reduzido (590nm – vermelho) e a sonda oxidada (510nm – verde). Neste ensaio as células foram incubadas com a sonda (5 $\mu$ M) simultaneamente aos estímulos, por 24h. As imagens mostram uma intensa marcação dos CLs pelo Bodipy C11 nos grupos estimulados com LPS + IFN $\gamma$  ou tratados com antimicina A se comparados ao controle. Podemos observar que parte da sonda presente nos CLs sofreu oxidação (Figura 14) sugerindo que os CLs sejam sítios de peroxidação de lipídios e/ou acúmulo de lipídios peroxidados. Interessante notar que em ambos os estímulos a oxidação da sonda nos CLs não ocorreu de forma homogênea, nas imagens podemos ver CLs em diferentes níveis de peroxidação.

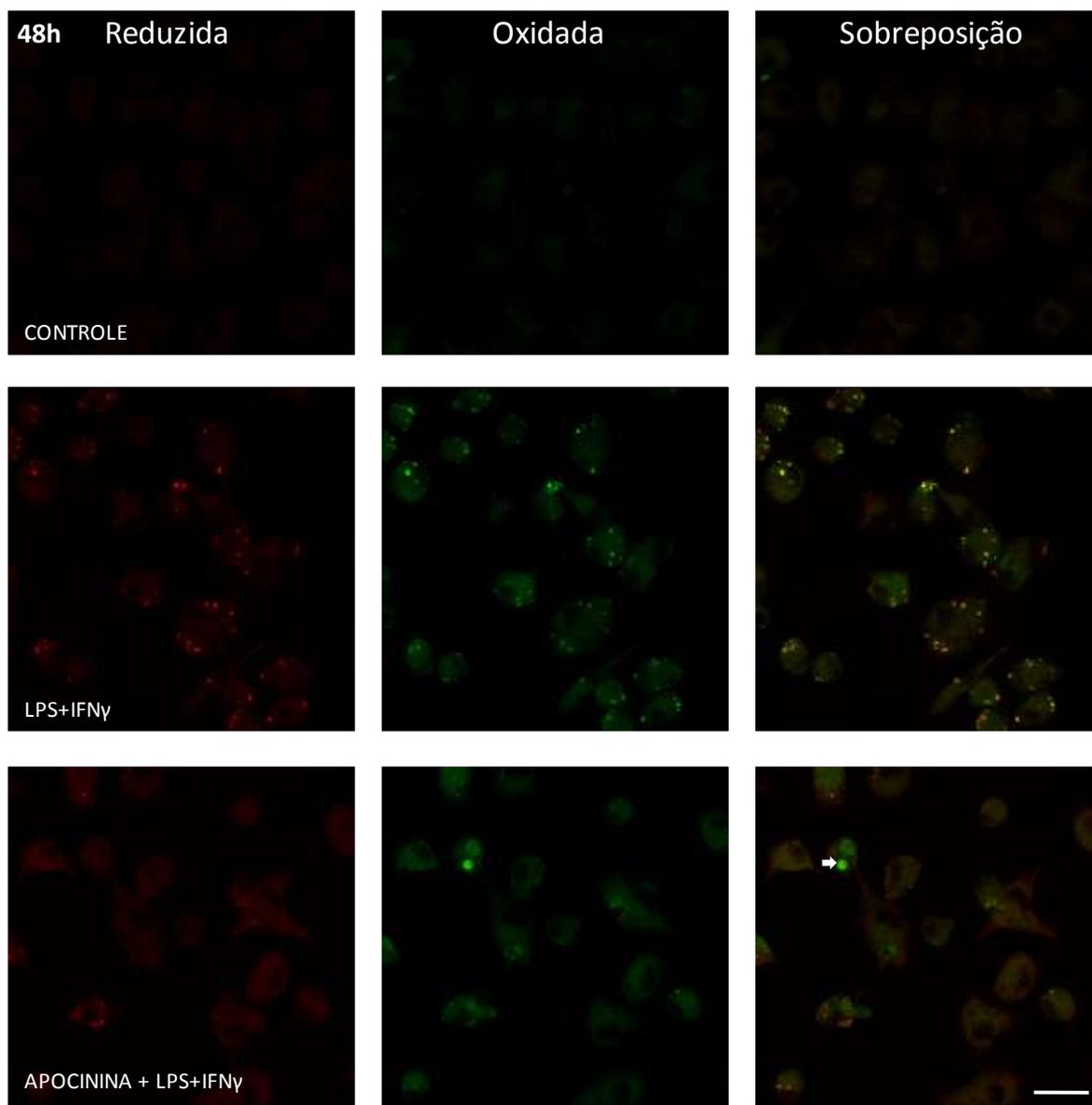
Após verificarmos que o estímulo com LPS + IFN $\gamma$  é capaz de induzir peroxidação lipídica em macrófagos, principalmente dos lipídios presentes nos CLs, avaliamos qual o papel de ROS produzido pela NADPH oxidase neste processo. Para isso pré-tratamos as células com 500 $\mu$ M apocinina, 1h antes do estímulo com LPS + IFN $\gamma$ , permanecendo por todo tempo de estímulo (24h ou 48h) e utilizamos o *Kit Image-iT® Lipid Peroxidation* como descrito anteriormente. As imagens confirmam a drástica redução do número de CLs nas células pré-tratadas com apocinina, após 24h (Figura 15) ou 48h (Figura 16) de estímulo com LPS+IFN $\gamma$ . Neste grupo, poucos pontos verdes (sonda oxidada) são visualizados nas imagens de microscopia confocal.



**Figura 14: Avaliação da peroxidação lipídica induzida pelo estímulo com LPS + IFN $\gamma$  ou tratamento com antimicina A.** As células foram estimuladas ou não com LPS + IFN $\gamma$  ou tratadas com antimicina A. Paralelamente ao estímulo adicionamos 5 $\mu$ M de Bodipy C11 581/591, sendo a sonda mantida por todo tempo de estímulo (24h). Barra de escala - 20 $\mu$ m.

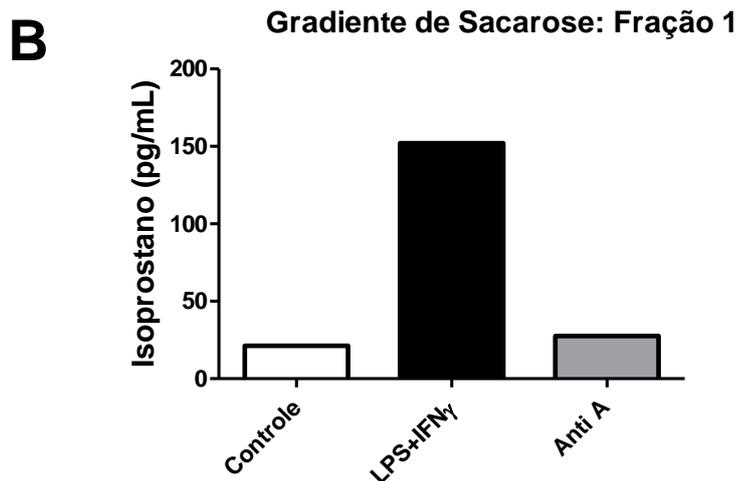
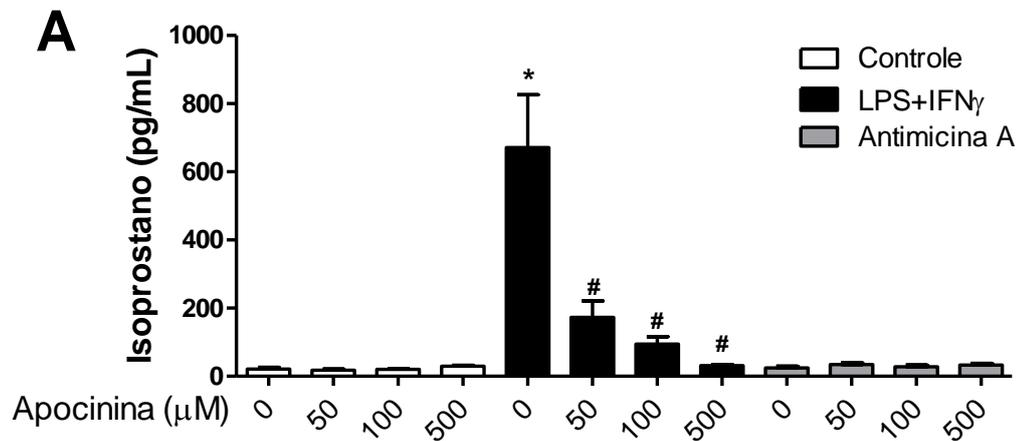


**Figura 15: Avaliação do efeito do pré-tratamento com Apocinina sobre a peroxidação lipídica induzida por LPS+IFN $\gamma$ .** As células foram pré-tratadas com apocinina (500 $\mu$ M) e estimuladas ou não com LPS + IFN $\gamma$ . Paralelamente ao estímulo adicionamos 5 $\mu$ M de Bodipy C11 581/591, sendo a sonda mantida por todo tempo de estímulo (24h). .Barra de escala - 20 $\mu$ m.



**Figura 16: Avaliação do efeito do pré-tratamento com apocinina sobre a peroxidação lipídica induzida por LPS+IFN $\gamma$ .** As células foram pré-tratadas com apocinina (500 $\mu$ M) e estimuladas ou não com LPS + IFN $\gamma$ . Paralelamente ao estímulo adicionamos 5 $\mu$ M de Bodipy C11 581/591, sendo a sonda mantida por todo tempo de estímulo (48h). A seta aponta para um corpo apoptótico fagocitado em estágio avançado de peroxidação, demonstrando a especificidade do ensaio. .Barra de escala - 20 $\mu$ m

Os isoprostanos são uma família de eicosanóides de origem não-enzimática produzidos pela ação de ROS sobre o ácido araquidônico. São formados tipicamente *in situ* a partir de fosfolipídios da membrana celular e então clivados pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub>. A formação de 8-isoprostano, um membro da classe F2 isoprostano, foi detectado em níveis elevados em condições fisiopatológicas nas quais o estresse oxidativo é aumentado (Montuschi et. al.1999). Uma vez que os CLs são um importante reservatório de ácido araquidônico intracelular, resolvemos investigar se, nas condições de estresse oxidativo analisadas os lipídios presentes nos CLs sofrem oxidação com conseqüente produção de 8-isoprostano. Primeiramente realizamos a dosagem por EIA do sobrenadante de cultura de macrófagos pré-tratadas ou não com apocinina e estimuladas por LPS+IFN $\gamma$  ou tratadas com antimicina A. Observamos que o estímulo com LPS+IFN $\gamma$  é capaz de induzir a produção de 8-isoprostano o que não acontece com o tratamento com antimicina A. O pré-tratamento com apocinina diminuiu de maneira dose-dependente a produção de 8-isoprostano induzido pelo estímulo com LPS+IFN $\gamma$  (Figura 17 A). Para realizar a dosagem de 8-isoprostano presentes especificamente nos CLs fizemos o isolamento destas organelas através de gradiente de sacarose submetido à ultracentrifugação. Tendo em vista que a maioria do isoprostano em amostras lipídicas se encontra esterificado utilizamos o protocolo de hidrólise sugerido pelos fabricantes. No gráfico referente às amostras de CLs purificados estão os valores obtidos a partir da fração 1 do gradiente que corresponde a fração rica em CLs. Observamos novamente que o estímulo com LPS+IFN $\gamma$  é capaz de induzir a produção de 8-isoprostano, mas não o tratamento com antimicina A (Figura 17 B). No entanto mais experimentos serão necessários para confirmar esse resultado.

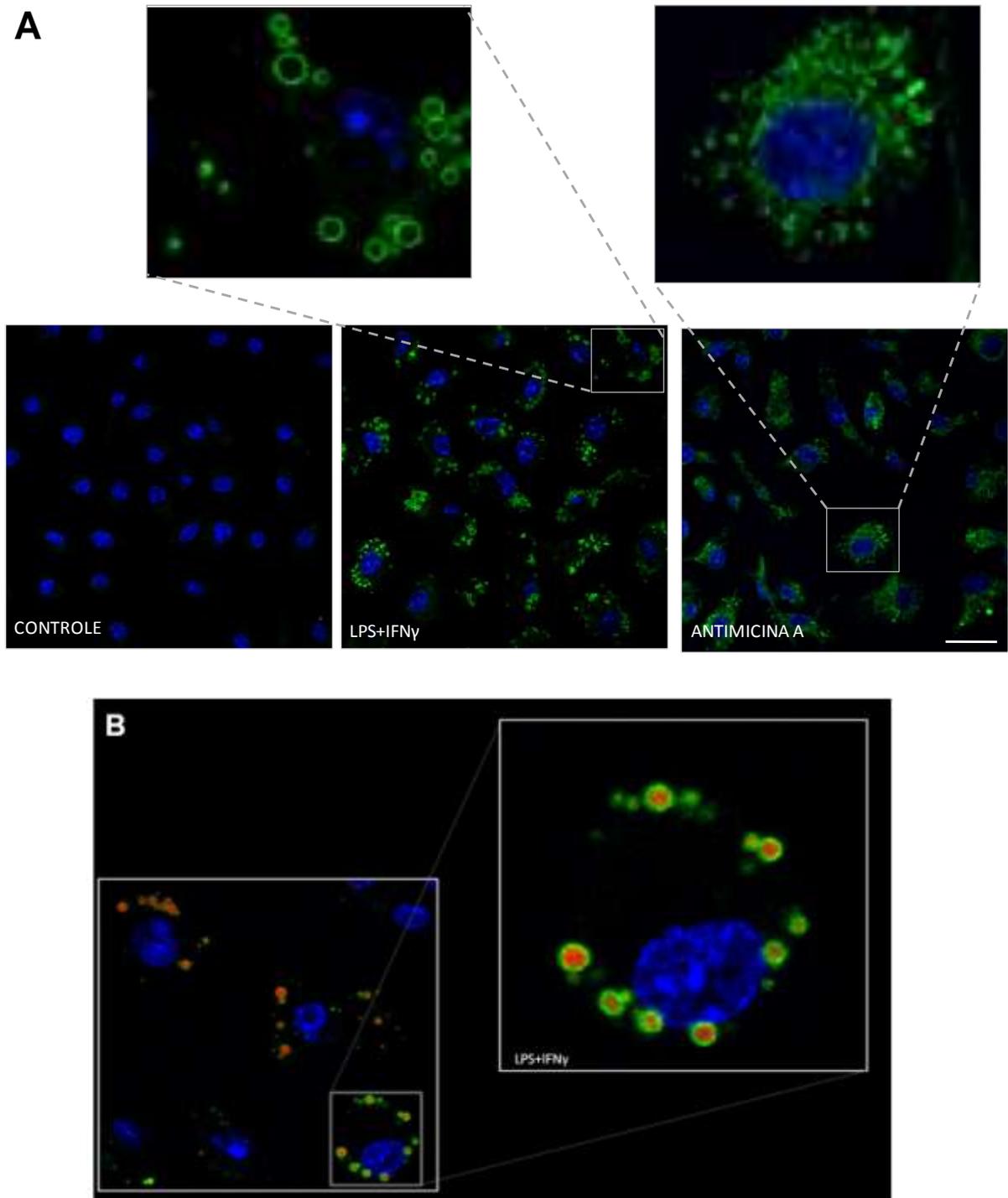


**Figura 17: Dosagem de 8-isoprostano no sobrenadante ou purificado de CLs de cultura de macrófagos estimuladas por LPS+IFN $\gamma$  ou tratadas com antimicina A:** Macrófagos foram pré-tratadas com apocinina em diferentes concentrações por 1h e posteriormente estimuladas ou não com LPS+IFN $\gamma$  ou antimicina A, por 24h. O pré-tratamento permaneceu por todo tempo de estímulo. Para o isolamento de CLs foram utilizadas  $20 \times 10^6$  macrófagos por grupo. (A) Gráfico da dosagem de 8-isoprostano no sobrenadante das culturas (N=3). Para análise estatística foi realizado ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ . As diferenças em relação ao grupo controle são indicadas pelo (\*) e em relação ao grupo estimulado sem apocinina (#). (B) Dosagem de 8-isoprostano na fração 1 do gradiente de sacarose (fração enriquecida em CLs). N=1.

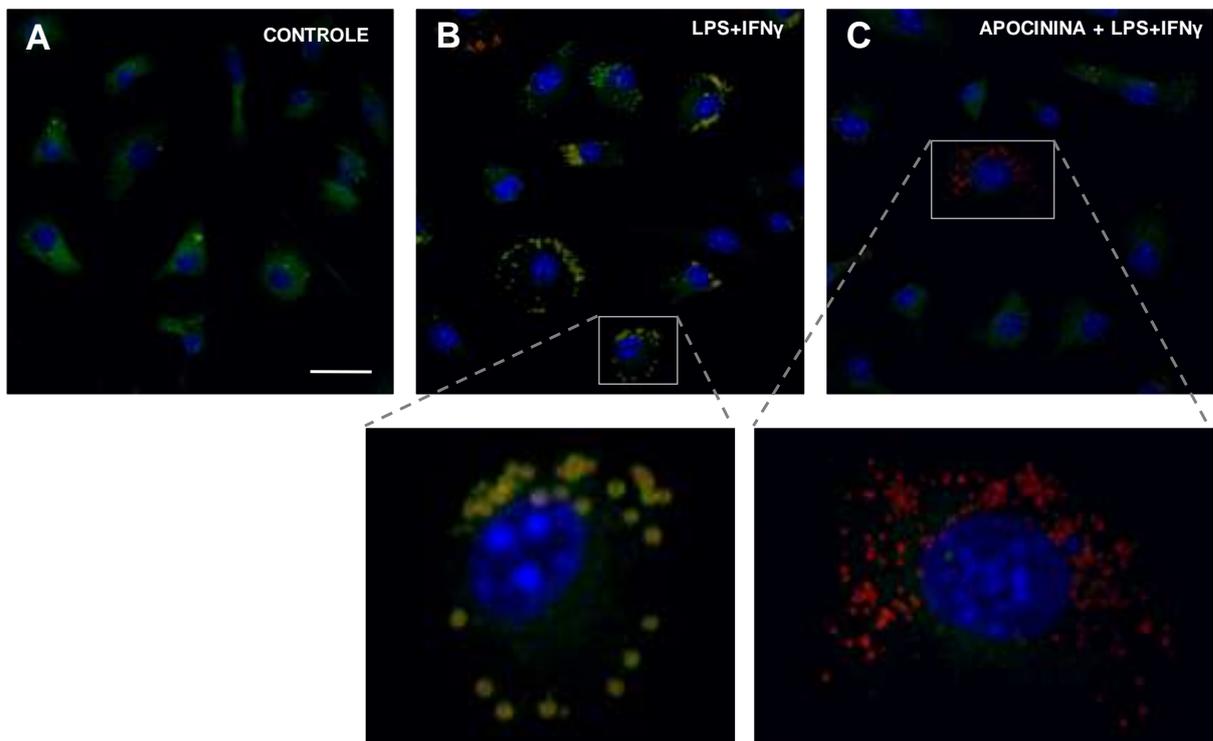
## 5.8 ROS induz a modificação de proteínas presentes nos CLs de maneira dependente da ativação de NADPH oxidase

Para avaliar se a peroxidação lipídica que ocorre nos CLs alteram seu conteúdo protéico utilizamos o *Kit Click-iT® LAA* Através da reação de Click catalisada pelo cobre, este kit detecta a formação de proteínas modificadas contendo grupamentos alcinos em suas cadeias laterais, decorrentes da peroxidação lipídica. Nossos resultados mostram que as proteínas presentes nos CLs de macrófagos estimulados com LPS+IFN $\gamma$ , predominantemente aquelas presentes na periferia da organela, se encontram modificadas pela peroxidação lipídica. A marcação das proteínas contendo grupamentos alcinos em suas cadeias laterais seguiu o padrão de formato anelar (Figura 18 A), similar aquele encontrado na imunomarcação da proteína estrutural de CLs, ADRP. O mesmo ocorreu nas células tratadas com antimicina A, mas neste caso, além das proteínas periféricas dos CLs, outros sítios de peroxidação protéica foram observados. Para confirmar se esta marcação anelar realmente margeava o conteúdo lipídico dos CLs utilizamos a sonda lipofílica *Nile Red* (Figura 18 B).

Para avaliar os efeitos do pré-tratamento com apocinina sobre as modificações em proteínas decorrentes da peroxidação lipídica induzida pelo estímulo com LPS + IFN $\gamma$  novamente utilizamos o *Kit Click-iT® LAA*. Como anteriormente o estímulo induziu a peroxidação das proteínas periféricas dos CLs o que não ocorre nas células controle (Figuras 19 A, B). O pré-tratamento com Apocinina, além de reduzir o número de CLs, reduziu os efeitos da peroxidação lipídica sobre suas proteínas (Figura 19 C). Em destaque, observamos uma das poucas células que apresentam CLs, marcados com a sonda de lipídios neutros *Lipidtox Red*, no grupo pré-tratado com apocinina e estimulado com LPS+IFN $\gamma$ . Nesta célula podemos notar a ausência da marcação para proteínas peroxidadas envolta dos CLs (Figura 19 C).



**Figura 18: Detecção de proteínas modificadas pela peroxidação lipídica em macrófagos estimulados com LPS+IFN $\gamma$  ou tratados com antimicina A.** As células foram estimuladas ou não com LPS + IFN $\gamma$  ou tratadas com antimicina A por 24h. Simultâneo aos estímulos adicionamos às culturas o análogo do ácido linoléico (alquino de linoleamida - LAA). As células foram fixadas e a marcação foi realizada segundo especificações do fabricante. (A) Imagens da marcação de proteínas modificadas pela peroxidação lipídica em formato anelar (verde) e o núcleo (azul - DAPI). (B) Marcação para proteínas modificadas (verde) sobreposta a marcação pela sonda de lipídios neutros *Nile Red* (vermelho). Barra de escala - 20 $\mu$ m.

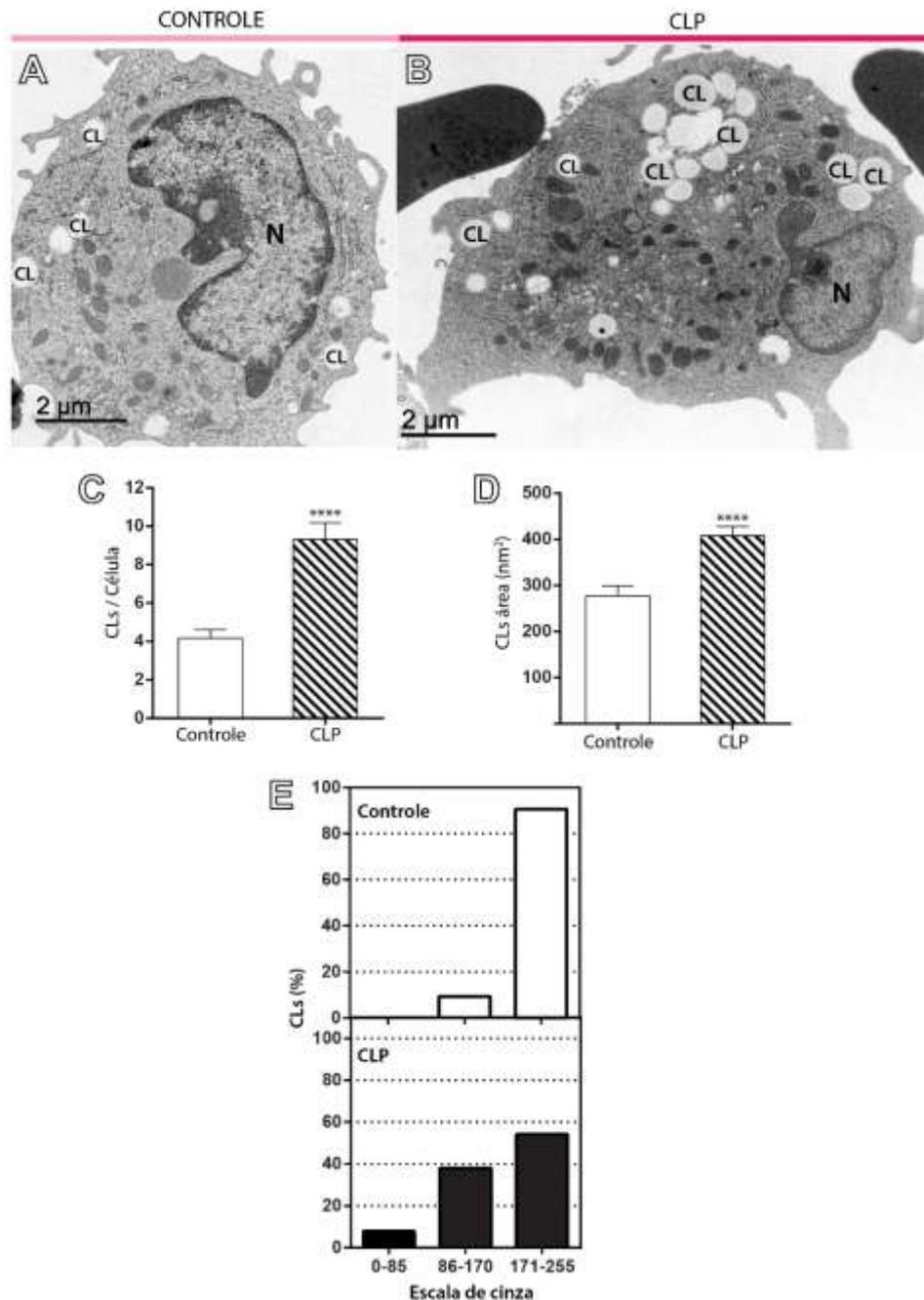


**Figura 19: Detecção de proteínas modificadas pela peroxidação lipídica em macrófagos pré-tratados com apocinina e estimulados com LPS+IFN $\gamma$  (24h).** Os macrófagos foram pré-tratados e estimulados como descrito previamente. Em (A) células do grupo controle, (B) células estimuladas com LPS + IFN $\gamma$  onde observamos a marcação das proteínas modificadas pela peroxidação lipídica em formato anelar (verde) margeando o conteúdo lipídico marcado pela sonda de lipídios neutros *Lipidtox* (vermelho) e o núcleo marcado com DAPI (azul). Em (C) observamos as células pré-tratadas com apocinina e estimuladas com LPS + IFN $\gamma$ , e neste caso os CLs apresentam apenas a marcação vermelha. Barra de escala - 20 $\mu$ m.

### **5.9 Biogênese de CLs e modificações de seu conteúdo protéico mediada por lipídios peroxidados ocorrem em células do peritônio durante a sepse experimental *in vivo***

Para avaliar a biogênese e as alterações ultraestruturais ocorridas nos corpúsculos lipídicos durante a sepse experimental nós submetemos camundongos Swiss ao modelo de sepse polimicrobiana CLP. Após 24h ou 48h os animais foram eutanasiados, coletamos o lavado peritoneal e preparamos para microscopia eletrônica de transmissão. Durante a sepse experimental (CLP) há um intenso influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal no período inicial da infecção, sucedido pela migração de células mononucleadas do sistema monócito/macrófago (Gomes et al., 2006b). Em nossas amostras a grande maioria das células presentes no grupo CLP 24h eram neutrófilos, e como estas células não eram foco deste estudo realizamos as análises apenas no grupo CLP 48h onde células semelhantes a macrófagos eram abundantes (Figura 20 A, B). Neste grupo observamos aumento tanto no número (Figura 20 C) quanto na área dos CLs (Figura 20 D) em comparação com o grupo controle (SHAM).

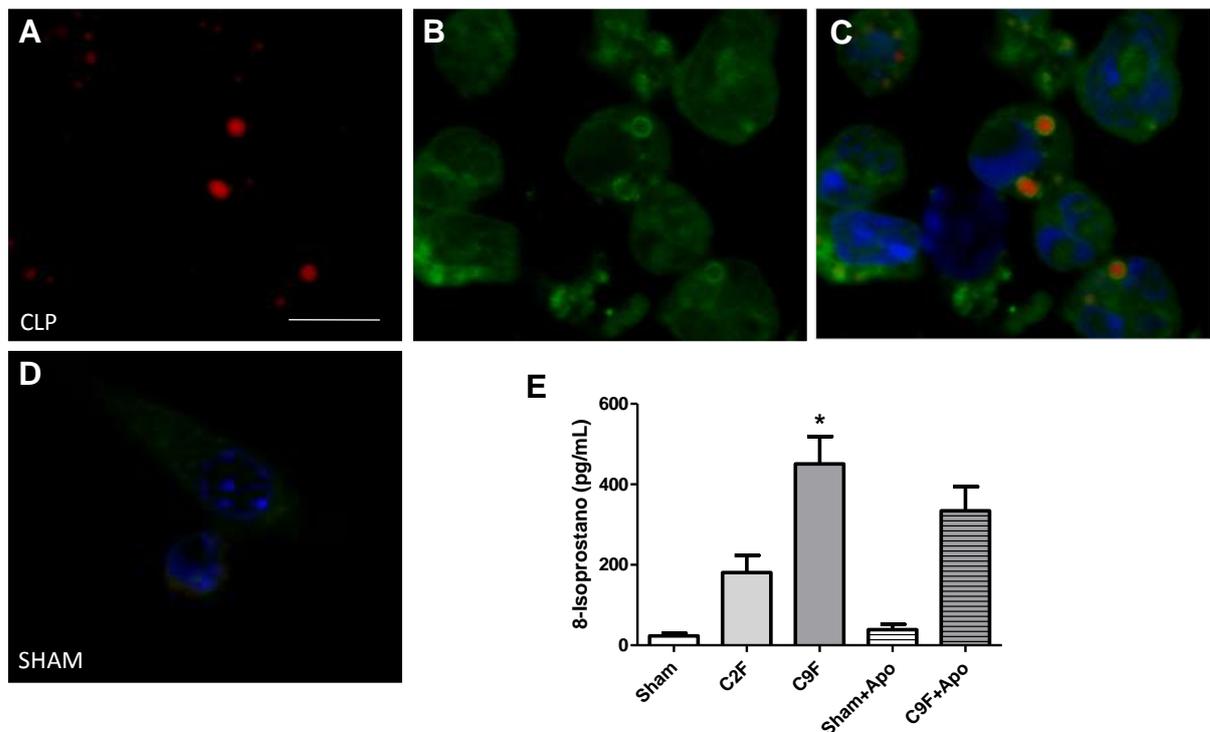
Tendo em vista que a elétron-densidade dos CLs foram associados com alterações em sua composição lipídica, analisamos digitalmente as micrografias eletrônicas convertendo as imagens para escala de cinza, e de acordo com a intensidade dos pixels categorizamos os CLs como elétron-densos (0-85), moderadamente elétron-densos (86-170) e elétron-lúcidos (171-255). Nossos resultados mostram que a grande maioria dos CLs encontrados nas células do lavado peritoneal dos animais do grupo controle é elétron-lúcido. Em contrapartida, nos animais submetidos ao CLP, há um aumento na elétron-densidade destas organelas percebido pela diminuição da porcentagem de CLs elétron-lucidos, aumento na porcentagem dos moderadamente elétron-densos e o aparecimento de CLs fortemente elétron-densos, característica ausente no grupo controle (Figura 20 E).



**Figura 20: Avaliação ultraestrutural de CLs em células do lavado peritoneal de camundongos Swiss 48h após o CLP.** (A, B) Micrografias eletrônicas representativas evidenciando o aumento de CLs em células de animais do grupo controle (A) em comparação com submetidos ao CLP (B), 48h após a cirurgia. Em (C) gráfico das médias do número de CLs e em (D) da área, em células do lavado peritoneal de animais submetidos ou não ao CLP. Em (E) temos a análise da elétron-densidade dos CLs. As análises foram feitas a partir de 30 micrografias (para cada grupo). O (\*) indica diferenças consideradas significativas em relação ao grupo controle (teste t não pareado),  $p < 0,05$ . As análises de número, área e elétron-densidade foram feitas utilizando o *software image J 1.41*. CL = Corpúsculos lipídicos, N = Núcleo.

Para avaliar se, assim como o modelo *in vitro*, o modelo de sepse experimental induz modificações protéicas decorrentes da peroxidação lipídica, camundongos C57bl/6 foram submetidos ao CLP (modelo de sepse branda - 2 furos no ceco) por 24h. Após a eutanásia, células do lavado peritoneal foram recolhidas e incubadas *ex vivo*, por 2h em estufa (5% de CO<sub>2</sub> a 37°C), com o LAA - análogo do ácido linoléico, seguido da marcação conforme especificações do fabricante. As células do grupo CLP apresentaram aumento no número de CLs (Figura 21 A) e suas proteínas periféricas se mostram susceptíveis a modificações decorrentes da peroxidação lipídica (Figura 21 B). Marcações em forma de anel margeando o conteúdo lipídico dos CLs foram visualizadas tanto em células mononucleadas quanto em polimorfonucleadas no grupo CLP (Figura 21 C), mas não no grupo controle (SHAM) (Figura 21 D).

Para avaliar a relação entre peroxidação lipídica e a gravidade do quadro séptico realizamos a dosagem de 8-isoprostano no sobrenadante do lavado peritoneal de animais submetidos à sepse branda (2 furos no ceco) e sepse grave (9 furos no ceco). Em paralelo incluímos um grupo pré-tratado com apocinina (20mg/kg, intraperitonealmente – 1h antes da cirurgia) e submetido ao modelo de sepse grave. Nossos resultados mostram uma associação positiva entre os níveis de 8-isoprostano e a gravidade do modelo de sepse. O pré-tratamento com apocinina, apesar da tendência, não foi capaz de reduzir a formação de 8-isoprostano (Figura 21 E).

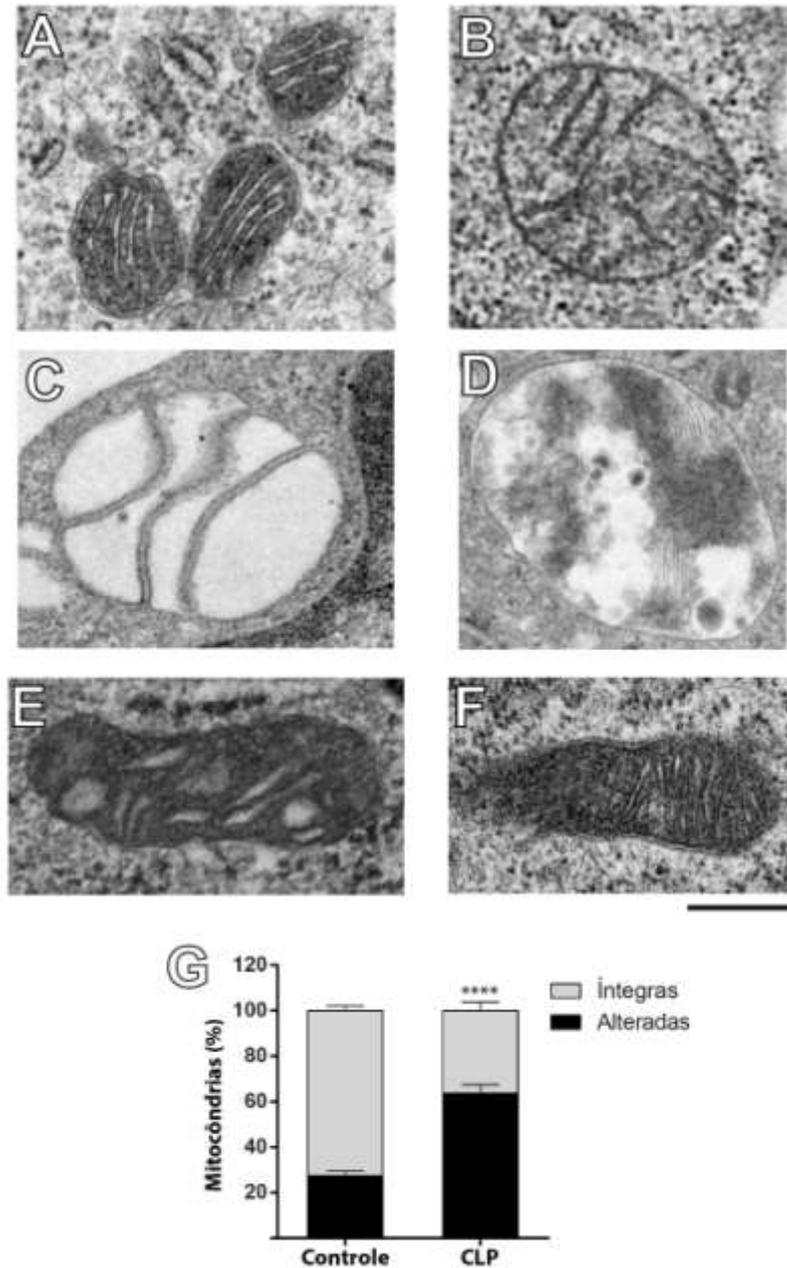


**Figura 21: Detecção de proteínas modificadas pela peroxidação lipídica e dosagem de 8-isoprostano *in vivo*.** Camundongos C57bl/6 foram submetidos ao modelo de sepse branda (CLP - 2 furos no ceco) e eutanasiados após 24h. (A) Células peritoneais marcadas com a sonda de lipídios neutros *Lipidtox red* (vermelho) e em (B) a marcação de proteínas modificadas pela peroxidação lipídica (verde). (C) Sobreposição das imagens (A) e (B) evidenciando as proteínas modificadas margeando o conteúdo lipídico dos CLs. (D) A sobreposição das mesmas marcações em células peritoneais do grupo SHAM (controle). Núcleo marcado com DAPI (azul). (E) Gráfico da dosagem de 8-isoprostano feita a partir do sobrenadante do lavado peritoneal de animais submetidos ou não a sepse branda (2 furos) e grave (9 furos). Para análise estatística foi realizado ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ . As diferenças em relação ao grupo controle são indicadas pelo (\*) N=6 animais.

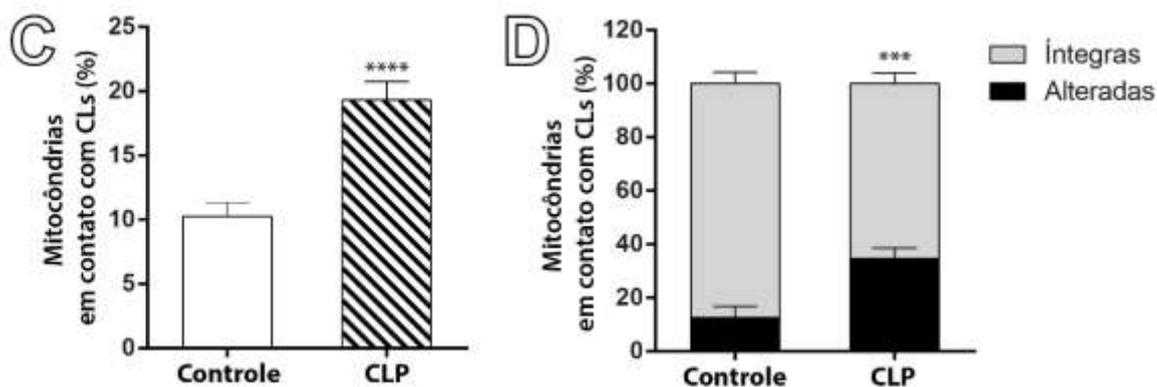
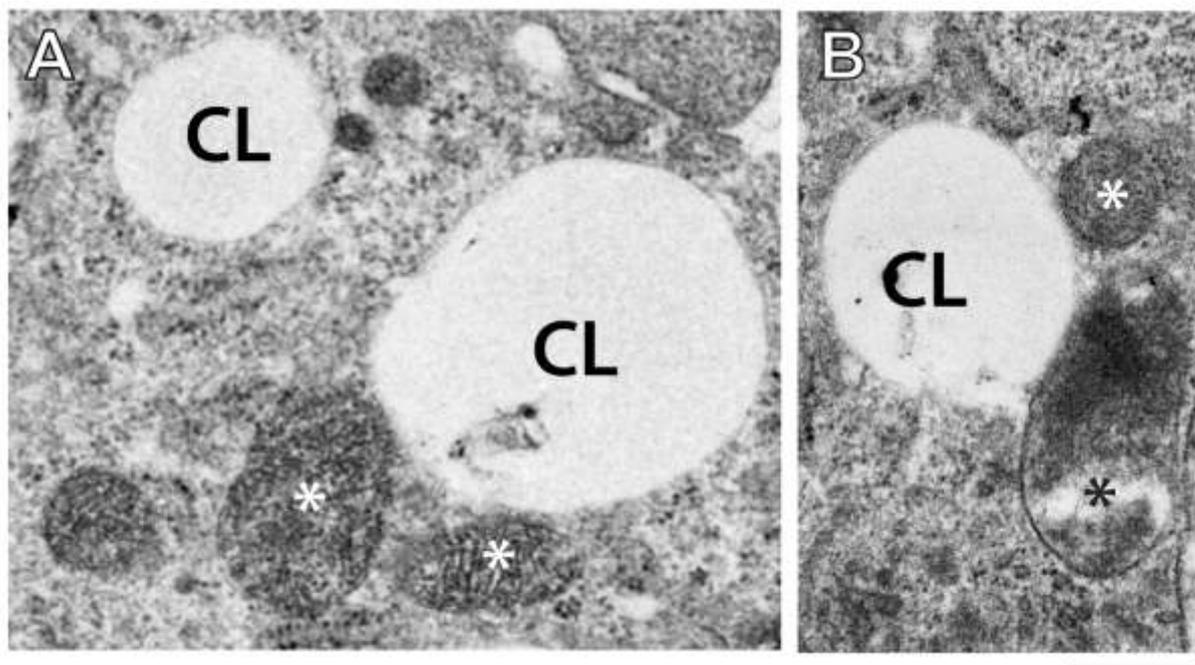
### **5.10 CLP induz alterações ultraestruturais nas mitocôndrias principalmente quando estas se encontram associadas aos CLs**

Tendo em vista a importância da disfunção mitocondrial na sepse, realizamos um estudo detalhado das alterações ultraestruturais presentes nesta organela em células semelhantes a macrófagos presentes no lavado peritoneal de animais submetidos ou não ao CLP, 48h após a cirurgia. Comparadas as mitocôndrias íntegras (Figura 22 A), em nosso modelo observamos que o CLP induz diferentes alterações na ultraestrutura mitocondrial tais como desestruturação e redução do número de cristas (Figura 22 B, C, D, E), esvaziamento da matriz mitocondrial (Figura 22 C), vacuolização (Figura 22 E), tumefação mitocondrial (aumento de volume) (Figura 22 C, D) e rompimento do envoltório mitocondrial (Figura 22 F). A ocorrência destas alterações aumentou significativamente nas células do grupo CLP se comparadas ao grupo controle (Figura 22 G).

CLs e mitocôndrias são organelas que estabelecem interações frequentes e, tendo em vista que os componentes protéicos e lipídicos dos CLs são susceptíveis a oxidação nós nos perguntamos se esta interação poderia contribuir com a disfunção mitocondrial ocorrida durante a sepse experimental. Por microscopia eletrônica de transmissão inicialmente nós avaliamos se durante a sepse experimental (CLP) ocorre um aumento na associação entre CLs e mitocôndrias em células semelhantes a macrófagos presentes do lavado peritoneal. Nossos resultados mostram que a indução do processo séptico pelo modelo de CLP dobra os eventos de interação entre CLs e mitocôndrias (Figura 23 A-C). Além disso as mitocôndrias envolvidas nesta interação nas células do grupo CLP apresentam porcentagem maior de danos ultraestruturais do que aquelas na mesma situação no grupo controle (Figura 23 D), sugerindo que a interação com CLs no grupo séptico possa favorecer o aparecimento de danos ultraestruturais nas mitocôndrias.



**Figura 22: Análise ultraestrutural de mitocôndrias em células do lavado peritoneal de camundongos Swiss 48h após o CLP.** A partir de micrografias eletrônicas de transmissão analisamos as alterações ultraestruturais presentes em mitocôndrias dos grupos controle ou CLP. (A) Mitocôndria considerada morfologicamente íntegra. (B-F) Alterações quantificadas, como (C, D, E) a desestruturação das cristas, (B) redução em seu número, (C) esvaziamento da matriz mitocondrial, (E) vacuolização, (C,D) Tumefação mitocondrial (aumento de volume) e (F) rompimento do envoltório mitocondrial. Barra de escala=1,66 (C, D), 400 (A,B), 350 (E,F). (G) Gráfico da porcentagem de mitocôndrias íntegras e alteradas por grupo. Foram analisadas 398 mitocôndrias no grupo controle e 393 no CLP. O (\*) indica diferenças consideradas significativas em relação ao grupo controle (teste t não pareado),  $p < 0,05$

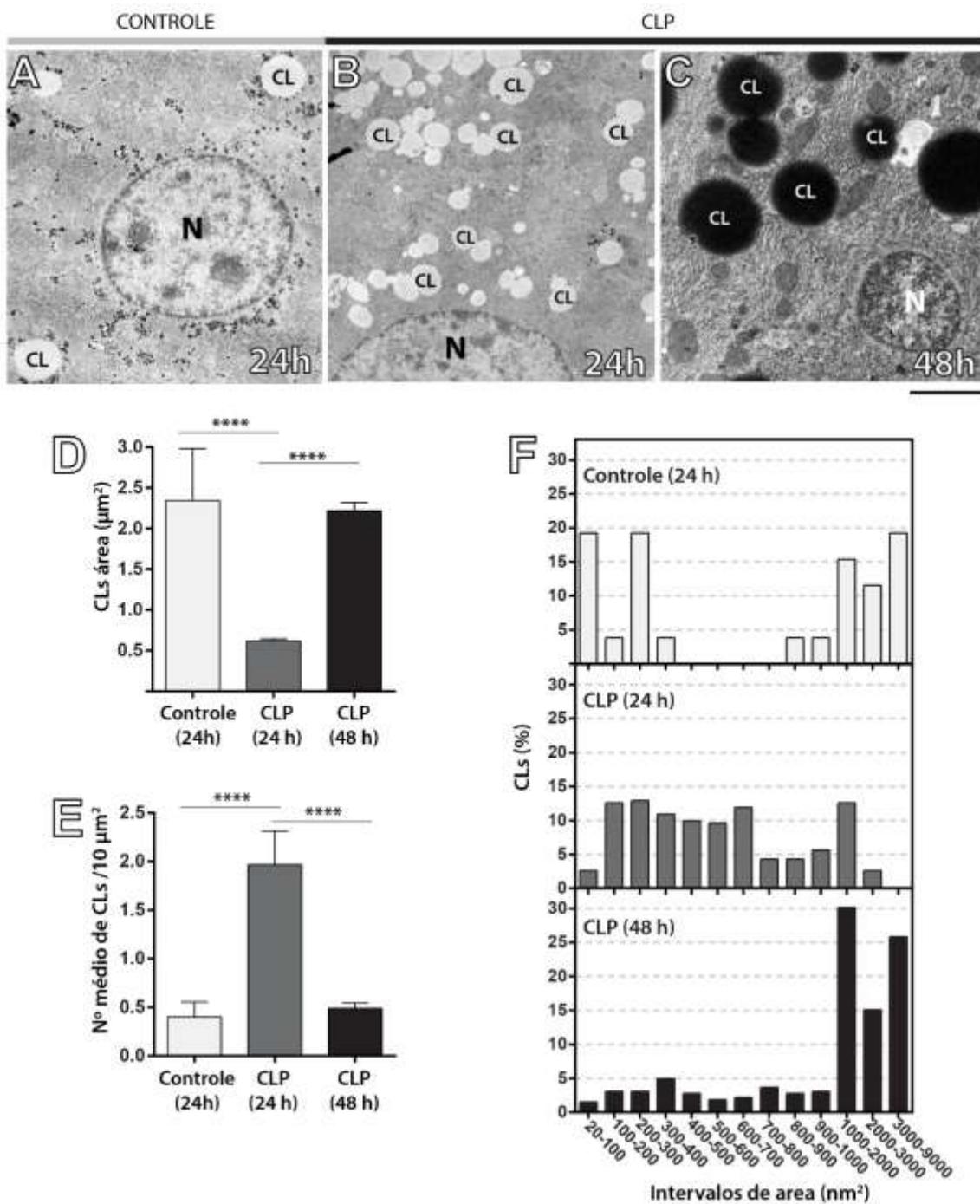


**Figura 23: Avaliação da interação entre CLs e mitocôndrias (íntegras e alteradas) em células do lavado peritoneal de camundongos Swiss 48h após o CLP.** (A, B) Micrografias eletrônicas de células do lavado peritoneal de animais submetidos ao CLP destacando tanto a interação entre CLs e mitocôndrias quanto os sinais de dano ultraestrutural das mitocôndrias envolvidas nesta interação. CLs= Corpúsculo lipídico, \*= Mitocôndria, Barra de escala: 500nm (A), 660nm (B). (C) Gráfico da porcentagem de mitocôndrias estabelecendo interação com CLs nos grupos controle e CLP. Em (D) gráfico da porcentagem de mitocôndrias estabelecendo interação com CLs que apresentaram sinais de alteração ultraestrutural. O (\*) indica diferenças consideradas significativas em relação ao grupo controle (teste t não pareado),  $p < 0,05$ .

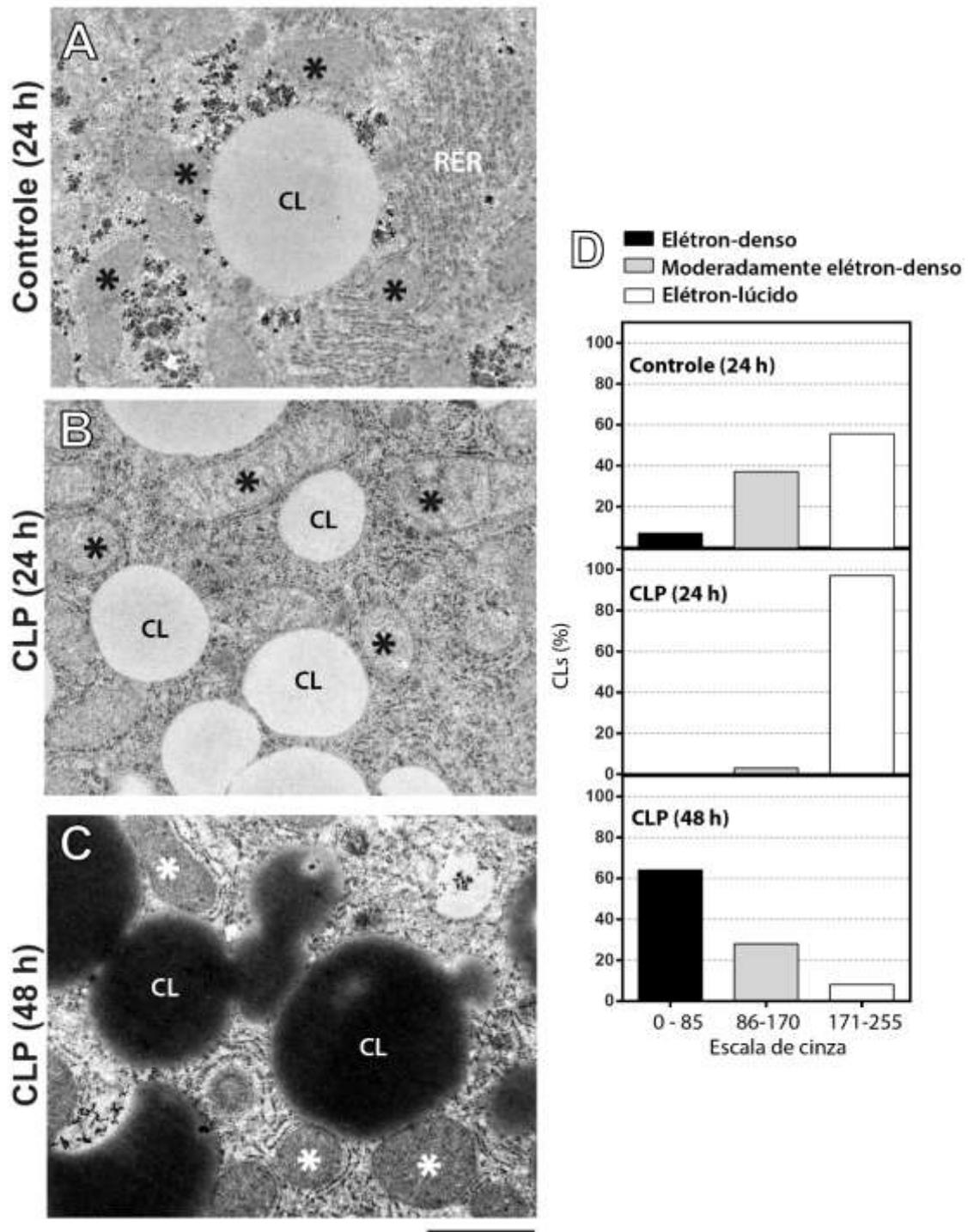
### 5.11 Sepse induz a biogênese e alterações ultraestruturais dos CLs em paralelo com danos no tecido hepático

O fígado é um órgão central no controle da homeostase lipídica do organismo e sua fisiologia é profundamente alterada durante a sepse (Nessler et al., 2012) justificando a avaliação da formação e ultraestrutura dos CLs no tecido hepático de camundongos Swiss submetidos ao CLP. Após 24h da cirurgia observamos um aumento pronunciado no número de CLs no fígado dos animais submetidos ao CLP em comparação com o controle (Figura 24 A, B e E). Entretanto, após 48h da cirurgia a média do número de CLs já não difere do controle (Figura 24 C e E). Ao avaliar os CLs por área observamos que, apesar de numerosos, os CLs formados após 24h são em média menores em tamanho, se comparados ao controle. Já os CLs formados após 48h da cirurgia, apresentam em média área semelhante aos CLs encontrados no grupo controle. No entanto, ao escalonar os valores de área obtemos uma percepção mais clara de que a maioria dos CLs do grupo CLP 48h é grande medindo entre  $1-9\mu\text{m}^2$  (Figura 24 F).

Ao analisar as micrografias eletrônicas do tecido hepático, a alteração ultraestrutural mais facilmente observada foi a mudança de elétron-densidade dos CLs ao longo do tempo após a cirurgia de CLP. Para esta avaliação utilizamos novamente o *software image J*, convertendo as imagens para a escala de cinza e analisando a intensidade dos pixels das áreas dos CLs. Nossos resultados mostram que os CLs formados após 24h da cirurgia são quase exclusivamente elétron-lúcidos (Figura 25 B e D), diferindo do grupo controle (Figura 25 A e D) que apesar de apresentar de apresentar maioria também nesta categoria, apresenta quase 40% na categoria moderadamente elétron-densos, e pouco mais de 5% na categoria fortemente elétron-densos. Após 48h da cirurgia foi observada uma alteração drástica da elétron-densidade (Figura 25 C e D). Neste grupo mais de 60% dos CLs se enquadram na categoria elétron-densos, mais de 20% na categoria moderadamente elétron-densos e apenas uma pequena parcela de CLs elétron-lúcidos. Como comentado anteriormente, estas alterações de elétron-densidades estão relacionadas a mudanças no conteúdo lipídico destas organelas. Sendo assim, estes resultados sugerem que a sepse experimental induz alterações no conteúdo lipídico dos CLs formados no tecido hepático.



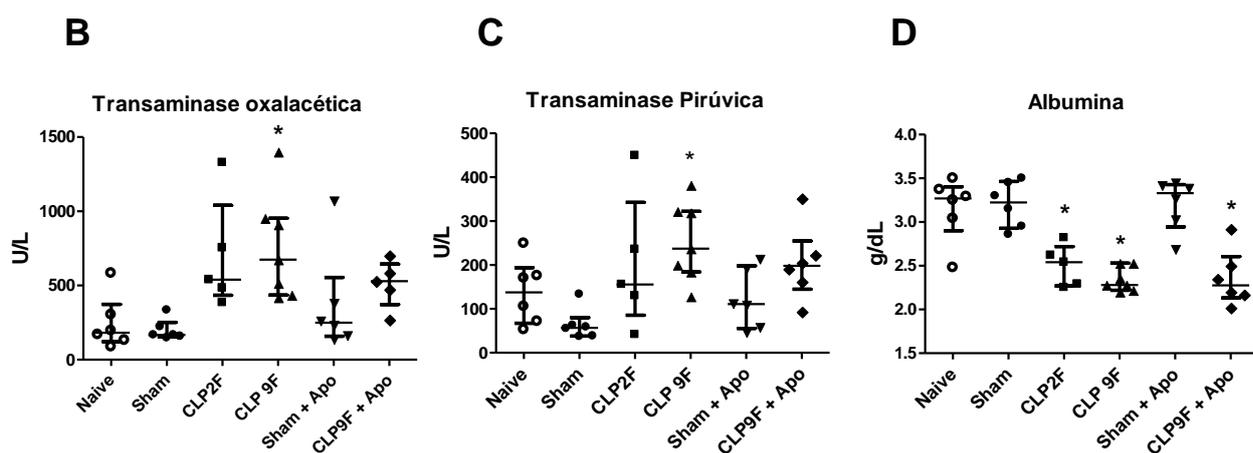
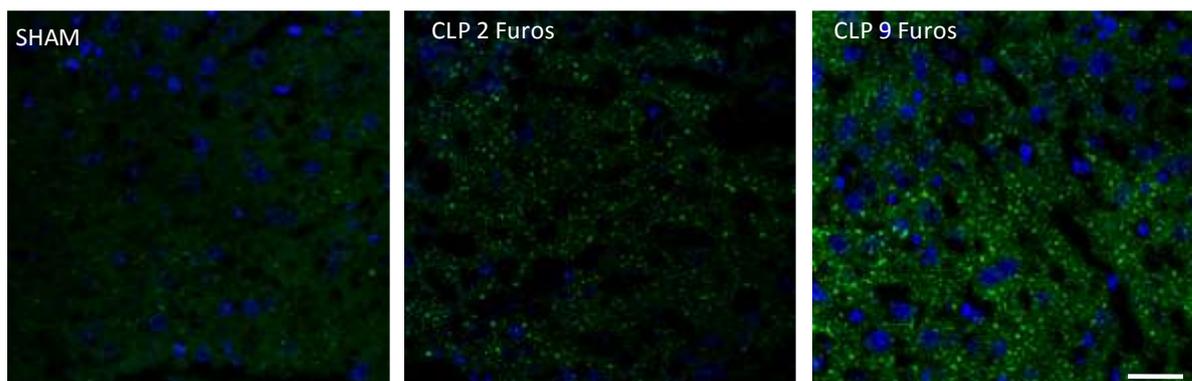
**Figura 24: Avaliação quantitativa e morfométrica de CLs no tecido hepático de camundongos submetidos ao CLP.** Camundongos Swiss foram submetidos ou não ao CLP, após 24 ou 48h da cirurgia, o fígado foi coletado e processado para MET. Micrografias eletrônicas representativas do fígado dos animais (A) SHAM (controle), (B) CLP 24h e (C) CLP 48h. (D) Gráfico da média das áreas dos CLs. (E) Gráfico da média do número de CLs a cada  $10\mu\text{m}^2$  de tecido. (F) Gráfico do escalonamento dos CLs por intervalo de área. O (\*) indica diferenças consideradas significativas em relação ao grupo controle. Teste estatístico Anova, seguido do pós teste de Tukey,  $p < 0,0001$ . Barra de escala: (A)  $4\mu\text{m}$ , (B)  $3,5\mu\text{m}$  e (C)  $2\mu\text{m}$ .



**Figura 25: Avaliação da elétron-densidade dos CLs induzidos pela sepse experimental no fígado de camundongos Swiss.** Camundongos Swiss foram submetidos ou não ao CLP, após 24 ou 48h da cirurgia, o fígado foi coletado e processado para MET. (A, B e C) Micrografias eletrônicas representativas de CLs dos grupos controle, CLP 24h e CLP 48h, respectivamente. (D) Gráfico da porcentagem de CLs escalonados por elétron-densidade. As análises de elétron-densidade foram feitas utilizando o software image J 1.41. CL: Corpúsculos lipídicos, \*: Mitocôndrias, RER: Retículo endoplasmático rugoso. Barra de escala: 2 $\mu$ m.

O modelo experimental de CLP é o que melhor mimetiza os eventos sépticos humanos, tanto a fase hemodinâmica quanto a fase metabólica, e tem a possibilidade de ajustar a gravidade da sepse variando o tamanho da agulha e a quantidade de furos feitos no ceco e é, portanto, considerado padrão ouro no estudo da sepse. Neste experimento utilizamos um modelo de sepse branda (2 furos) e de sepse grave (9 furos). Para avaliar o envolvimento da NADPH oxidase nas alterações no metabolismo hepático induzidas pela sepse acrescentamos também um grupo submetido à sepse grave pré-tratado com apocinina (20mg/Kg), 1h antes da cirurgia. Após 24h do CLP, coletamos o soro, de onde dosamos diferentes enzimas relacionadas ao metabolismo hepático.

As imagens revelaram um aumento progressivo do número de CLs no fígado de acordo com a gravidade do quadro séptico (Figura 26 A). Em paralelo os níveis de transaminase oxalacética (Figura 26 B) e transaminases pirúvica (Figura 26 C), marcadores de dano hepático, também aumentaram de acordo com a gravidade do modelo de sepse utilizado. Os níveis de albumina sérica (Figura 26 D) reduziram progressivamente de acordo com o modelo em comparação com o controle e indicam aumento de permeabilidade vascular, importante fator na fisiopatologia da sepse. Apesar de apresentar uma tendência em diminuir os marcadores de dano hepático, o pré-tratamento com apocinina, no esquema experimental utilizado, não reduziu as alterações avaliadas induzidas pelo modelo de sepse experimental. Entretanto mais experimentos variando o esquema terapêutico serão necessários para melhor avaliar o papel da apocinina.

**A**

**Figura 26: Avaliação da formação de CLs e função hepática após a indução de sepse experimental com diferentes níveis de gravidade.** Camundongos C57Bl/6 foram submetidos a sepse branda (2 furos no ceco) ou sepse grave (9 furos no ceco). Uma parcela dos animais submetidos a sepse grave foram pré-tratados com apocinina (20mg/Kg), intraperitonealmente, 1h antes da cirurgia. Após 24h os animais foram eutanasiados, recolhemos o sangue para obtenção do soro e o fígado. (A) Criosecções do fígado de animais do grupo controle, CLP 2 furos e CLP 9 furos coradas com a sonda de lipídios neutros *Bodipy* (verde) e com o marcador de núcleo DAPI (azul). (B, C e D) Gráficos das dosagens séricas de transaminase oxalacética, transaminase pirúvica e albumina, respectivamente. O (\*) indica diferenças consideradas significativas em relação ao grupo controle. Teste estatístico Anova, seguido do pós teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Barra de escala: 30 $\mu$ m. N=6 animais por grupo.

## 6 Discussão:

A sepse é a principal causa de morte nas unidades de terapia intensivas (UTIs), a maioria atribuída a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (MODS) (Ramírez, 2013). Associada à resposta inflamatória descontrolada, a inadequada oxigenação tecidual tem sido há muito apontada como possível mecanismo indutor da disfunção orgânica. No entanto, as medidas destinadas a otimizar a perfusão do tecido trazem pouco ou nenhum benefício no contexto da falência orgânica induzida pela sepse (Boekstegers et al., 1994; Gattinoni et al., 1995; Hayes et al., 1994; Sair et al., 2001). Inúmeras evidências indicam que a falência de órgãos induzida pela sepse estão associadas às alterações fundamentais no metabolismo celular e que hipóxia tecidual não desempenha um papel central neste processo (Levy et al., 2005; Pravda, 2014; VanderMeer et al., 1995). Esta visão encontra embasamento nas observações de manifestações clínicas da insuficiência de órgãos mesmo na ausência de morte celular significativa, e também na recuperação (quase) completa da função de órgãos, incluindo aqueles cujas células têm baixa capacidade de regeneração em pacientes que sobrevivem ao quadro séptico (Hotchkiss et al., 1999; Noble et al., 2001).

A teoria conhecida como hipóxia citopática, proposta por Fink, postula que alterações no metabolismo energético ocorrido na sepse se dá não apenas porque a entrega de  $O_2$  aos tecidos é prejudicada, mas também, e talvez ainda mais importante, porque a capacidade das células para utilizar disponível de  $O_2$  é comprometida (Fink, 2001). As mitocôndrias são as organelas centrais no consumo de oxigênio, e os mecanismos de disfunção mitocondrial têm recebido cada vez mais destaque na patogênese da sepse (Crouser, 2004; Singer, 2013). A diminuição do consumo de  $O_2$  e conseqüente queda na produção de ATP são observados tanto em modelos experimentais quanto em pacientes sépticos, e neste último caso, a queda de consumo do oxigênio está associada à gravidade do quadro (KREYMANN et al., 1993; Rosser et al., 1998). Estas alterações foram detectadas mesmo em tecidos devidamente perfundidos, sugerindo que a disfunção mitocondrial pode se desenvolver independente da hipoperfusão e hipóxia tecidual (Crouser et al., 2002, 1997).

Além das alterações bioenergéticas, aumento do estresse oxidativo e produção de espécies reativas têm sido associados à sepse e à disfunção orgânica (Andrades et al., 2009; Crimi et al., 2006). O sistema imune ativado e a disfunção

mitocondrial são as duas maiores fontes de espécies reativas no organismo (Halliwell e Gutteridge, 2007). Durante a sepse, é característico o aumento na produção de ROS e RNS na circulação, via ativação de células endoteliais e do sistema imune, e nos órgãos afetados, principalmente devido aos processos de disfunção mitocondrial e alterações nas defesas anti-oxidantes (Andrades et al., 2009; Dare et al., 2009). Algumas destas moléculas atuam diretamente em vias de sinalização, enquanto outros provocam efeitos deletério em diversas estruturas celulares.

A alteração do metabolismo lipídico é um evento precoce e consistente durante os processos de infecção/inflamação. Durante a sepse estas alterações incluem aumento da síntese de ácidos graxos, a ativação da lipólise no tecido adiposo, e a supressão da oxidação e cetogênese. O excesso de ácidos graxos livres gerado é então canalizado para a esterificação o que explica o aumento nos níveis de TAG séricos observados nos pacientes (Khovidhunkit et al., 2004). A nível intracelular, aumento na formação de CLs tem sido demonstrado, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, após estimulação com LPS, em modelos experimentais de sepse e também em amostras de pacientes sépticos (Pacheco et al., 2002). Durante a sepse a associação entre estresse oxidativo, produção de ROS e biogênese de CLs não é completamente compreendida. Neste trabalho avaliamos o envolvimento de ROS, de origem mitocondrial e citoplasmática (via NADPH oxidase), na biogênese de CLs e também e nas alterações de seus componentes decorrentes do processo de oxidação.

O aumento de ROS após o estímulo por LPS foi demonstrada em diferentes modelos de choque séptico em macrófagos peritoniais e linfócitos (Victor e De La Fuente, 2003; Víctor et al., 1998). Utilizando macrófagos derivados de medula óssea nós observamos que o estímulo com LPS + IFN $\gamma$  é capaz de aumentar a produção de ROS total e ROS de origem mitocondrial mensurados com o auxílio das sondas DHE e MitoSox, respectivamente. Por citometria de fluxo e/ou microscopia confocal pudemos observar que a produção de ROS de ambas as fontes ocorre de maneira precoce, podendo ser detectada após 30 min de estímulo. Ensaio utilizando estas sondas por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência, apesar de amplamente utilizados como sensor de ânions superóxido, têm apresentado limitações técnicas (Zielonka e Kalyanaraman, 2010). A hidroetidina (HE), molécula base de ambas as sondas, é sintetizada a partir de duas reduções do cátion etídio (Thomas e Roques, 1972). Esta molécula reage prontamente com ânions

superóxidos formando um produto fluorescente vermelho específico, o 2-hidroetídio (2-OH-E<sup>+</sup>) (Zhao et al., 2003). Entretanto, no ambiente celular a hidroetidina pode sofrer oxidação não específica e gerar outros intermediários fluorescentes vermelhos, incluindo o etídio (E<sup>+</sup>), que interferem nos resultados quando técnicas baseadas em fluorescência são aplicadas (Zhao et al., 2005).

A metodologia mais indicada atualmente para mensurar a formação de superóxido utilizando sondas baseadas em hidroetidina é o HPLC (Kalyanaraman et al., 2014). Por esta técnica é possível distinguir e quantificar os diferentes produtos da oxidação do HE, incluindo o 2-OH-E<sup>+</sup> gerado especificamente pela oxidação via ânions superóxidos. As principais limitações desta técnica no momento incluem o período relativamente longo de análise (entre 30-75 min por amostra) e a necessidade de otimizar o protocolo de extração e aumentar sua eficiência. Como em nossos experimentos utilizamos apenas métodos baseados em fluorescência, tomando de maneira isolada esses resultados, poderíamos afirmar apenas que o estímulo com LPS + IFN $\gamma$  induziram o aumento de agentes oxidantes tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias. No entanto, os experimentos seguintes utilizando ferramentas farmacológicas e/ou genéticas que modulam a produção ou disponibilidade de ROS dão suporte às afirmações de seu envolvimento nos mecanismos estudados.

Ao constatar que a produção de ROS, tanto de origem citoplasmática quanto mitocondrial, precedia temporalmente a produção de CLs, decidimos avaliar se ROS estariam envolvidos nos mecanismos associados à biogênese de CLs. Primeiramente, testamos a hipótese de que a disfunção mitocondrial pudesse levar à formação de CLs. Esta relação ficou evidente quando realizamos o bloqueio direto do complexo III da cadeia transportadora de elétrons pelo tratamento com a antimicina A. Além do esperado aumento na produção de ROS, um aumento acentuado no número de CLs foi observado. A relação entre o funcionamento das mitocôndrias e biogênese de CLs foi sugerida previamente por meio de trabalhos utilizando RNAi contra proteínas da via de beta oxidação que mostrou ser um potente indutor de formação de CLs (Marín-Garcia et. al, 2008). Além disso, estudos recentes utilizando mutações em genes centrais na biologia mitocondrial de drosófilas, cujos homólogos humanos causam doenças neurológicas graves, também elevam o número de CLs em células da glia (Liu et al., 2015).

O aumento no número de CLs nos grupos estimulados com LPS + IFN $\gamma$  ou tratados com antimicina A foi acompanhado pelo aumento na expressão da proteína

ADRP, uma das principais proteínas estruturais dos CLs. É digno de nota que o aumento na expressão de ADRP ocorreu também quando os macrófagos foram tratados com outras drogas que interferem no funcionamento mitocondrial, como a rotenona e a oligomicina, o que descarta qualquer efeito inespecífico produzido pela antimicina A. ADRP é um membro da família das perilipinas ou PAT, que são proteínas estruturais presentes na superfície dos CLs e regulam os processos de estoque e hidrólise de lipídios (Sztalryd e Kimmel, 2014). A ADRP (Plin2) é uma perilipina expressa em diferentes tipos celulares e é classificada como uma perilipina não permutável, isso porque são majoritariamente encontradas associadas aos CLs. Na ausência de CLs, a ADRP é rapidamente degradada pelo proteassomo, desta forma o aumento na expressão desta proteína na célula é diretamente relacionado ao aumento de CLs (Xu et al., 2005).

Tendo em vista que a interrupção do fluxo normal de elétrons da cadeia transportadora nas mitocôndrias é capaz de induzir a formação de CLs, e que a disfunção mitocondrial caracterizada pelo aumento na produção de ROS precede temporalmente a biogênese de CLs em macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$ , avaliamos também se ROS teria papel na biogênese de CLs induzidos pelo estímulo com LPS+IFN $\gamma$ . Para ajudar a responder esta questão utilizamos um antioxidante específico para superóxidos mitocondriais, o mito-TEMPO. O mito-TEMPO é uma molécula formada pelo antioxidante nitróxido tempol covalentemente conjugado ao trifetilfosfônio, um cátion lipofílico capaz acumular nas mitocôndrias em proporções de 100-500 vezes maiores do que a apresentada pelo meio intracelular e por outras organelas (Ross et al., 2005; Smith e Murphy, 2010). O direcionamento é facilitado pelo potencial extremamente negativo apresentado pela membrana interna mitocondrial que favorece esse acúmulo seletivo. Antioxidantes nitróxidos são moléculas capazes de eliminar ânions superóxido cataliticamente de forma mimética a SOD (Krishna et al., 1996).

Nossos resultados mostraram que ROS de origem mitocondrial tem um papel importante na formação de CLs, uma vez que o pré-tratamento com mito-TEMPO foi capaz de diminuir significativamente o número de CLs induzidos por LPS + IFN $\gamma$ , o mesmo efeito não foi visualizado nas células pré-tratadas com este antioxidante e tratadas com antimicina A. No entanto, não podemos descartar a participação de ROS mitocondrial neste processo, uma vez que o mito-TEMPO é uma molécula *scavenger* (“sequestradora”) de ânions superóxidos, e esta reação é competitiva por natureza. Para a apropriada remoção, a molécula sequestradora precisa estar em

excesso para remover o substrato rápido o bastante à medida que é produzido. A dose de 100µM utilizada é considerada alta mas pode não ter sido suficiente para suplantiar a quantidade de ROS produzido pelas mitocôndrias após o tratamento com a antimicina A (Dikalova et al., 2010).

Apesar de já ser conhecido que o LPS induz alterações no metabolismo lipídico em macrófagos (Feingold et al., 2012), é a primeira vez que é demonstrado o papel de ROS de origem mitocondrial neste processo. A relação entre ROS e biogênese de CLs foi recentemente demonstrada em modelo de drosófila com mutações em genes mitocondriais. Nesse mesmo trabalho, o aumento na produção de ROS foi acompanhado por um intenso acúmulo de CLs em células da glia via ativação do eixo JNK/SREBP. A redução dos níveis de ROS pelo tratamento com N-acetil-cisteína ou pela super expressão da enzima SOD reduziu significativamente o número de CLs nestas células (Liu et al., 2015). A utilização de antioxidantes em modelos de sepse tem apresentado resultados animadores na redução da disfunção mitocondrial e lesão tecidual (Escames et al., 2007; Lowes et al., 2013, 2008; Şener et al., 2005; Supinski et al., 2009). Zapeline e colaboradores demonstraram que o tratamento com antioxidantes pode reverter os sinais mais precoces de disfunção mitocondrial, como a tumefação das mitocôndrias, liberação de citocromo C e o estresse oxidativo (Zapeline et. al, 2008). Patil e colaboradores demonstraram que o tratamento *in vivo* com mito-TEMPO pode reverter a disfunção mitocondrial renal, atenuando a injúria aguda dos rins induzida pela sepse e elevando as taxas de sobrevivência dos animais de 40% para 80% (Patil et. al.,2014). No mesmo ano, Sims e colaboradores demonstraram que a administração de mito-TEMPO no momento da ligação cecal e punção (CLP) não só reduziu os níveis de superóxido mitocondrial, como também melhorou a perfusão microcirculatória renal (Sims et al., 2014).

Tendo em vista que a redução na formação de CLs pelo tratamento com mito-TEMPO se deu de forma significativa, mas parcial, nos perguntamos se ROS de outras origens, que não a mitocondrial, poderiam contribuir para o processo de biogênese de CLs desencadeado pelo estímulo com LPS + IFN $\gamma$ . Durante a sepse, existem outras fontes importantes de ROS além da disfunção mitocondrial que desempenham importantes papéis em sua patobiologia, dentre elas a ativação de enzimas oxidases (Andrades et al., 2009). O complexo NADPH oxidase é uma importante fonte de geração ROS em diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos e neutrófilos. Suas diferentes isoformas são ativadas por estímulos diversos, incluindo PAMPs, DAMPs e mediadores inflamatórios (Babior, 2004;

Lambeth, 2004). De fato, a produção de ROS após o estímulo com LPS em leucócitos é primariamente mediada pelo complexo da NADPH oxidase (Bedard e Krause, 2007). Para avaliar a participação de ROS produzidos a partir da ativação do complexo NADPH oxidase na biogênese dos CLs, foram utilizadas duas abordagens metodológicas diferentes, uma farmacológica através do pré-tratamento com apocinina, e outra genética utilizando clones de macrófagos cuja subunidade p22phox do complexo NADPH oxidase foi deletada pela metodologia de CRISPR-Cas9.

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona, acetovanillona, CAS 498-02-2) é um metoxi-catecol extraído das raízes de uma planta originária do Himalaia a *Picrorhiza kurroa* (Atal et al., 1986). Descrita originalmente como um inibidor do processo de *burst* respiratório em fagócitos, a apocinina é um eficiente inibidor do complexo NADPH oxidase (NOX1 e NOX2 principalmente) e seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da translocação para a membrana do componente citosólico p47<sup>phox</sup>, provavelmente pela sua associação com resíduos tióis desta subunidade (Barbieri et al., 2004; Simons et al., 1990; Stolk et al., 1994; Ximenes et al., 2007). Na realidade, estes efeitos não são mediados pela apocinina diretamente. A apocinina é uma pró-droga e depende de sofrer oxidação mediada por peroxidases para ser convertida em um dímero simétrico 5,5' que de fato detém o efeito biológico citado (Simons et al., 1990; Ximenes et al., 2007). Esta conversão é rapidamente alcançada em células fagocíticas envolvidas na resposta inflamatória onde peróxido de hidrogênio e mieloperoxidases estão presentes em grandes quantidades. Em contraste, em células não-fagocíticas onde estes componentes estão praticamente ausentes, a apocinina não apresenta os mesmos efeitos sobre a ativação do complexo da NADPH oxidase (Heumüller et al., 2008; Vejrazka et al., 2005).

Em nosso estudo observamos que ROS produzido pela ativação da NADPH oxidase tem um papel importante na biogênese de CLs. O pré-tratamento com apocinina foi capaz de reduzir a fluorescência emitida pela oxidação de DHE induzido pelo estímulo com LPS+IFN $\gamma$ , mas não pelo tratamento com antimicina A, como era de se supor já que a principal fonte de ROS neste caso é mitocondrial. Correspondentemente, o pré-tratamento com a apocinina reduz significativamente o número de CLs induzido pelo estímulo com LPS + IFN $\gamma$  ou pela infecção por *E.coli* em macrófagos, chegando a níveis basais na dose de 500 $\mu$ M, efeito este não observado nas células tratadas com antimicina A.

Para confirmar a participação da NADPH oxidase na biogênese de CLs estimulados por LPS + IFN $\gamma$  geramos clones de macrófagos deficientes na proteína p22<sup>phox</sup>, subunidade transmembrana integrante dos complexos NOX1-4 (Kawahara et al., 2005), utilizando a técnica de edição gênica conhecida como CRISPR/Cas9. Inspirada no sistema de defesa de eucariotos contra vírus, esta técnica se baseia na capacidade da nuclease Cas9 ser guiada por pequenos RNAs, crRNA (CRISPR RNA) e tracrRNA (*trans-activating* crRNA), a alvos específicos dentro do genoma, e estimular a quebra da dupla-fita do DNA. Fundidos em uma quimera, estes dois RNAs associados a Cas9 formam um complexo conhecido como sgRNA:Cas9 (*single-guide*-RNA:Cas9) capaz de reconhecer e editar genes de maneira específica e com alto rendimento em uma variedade de tipos celulares e organismos (Jinek et al., 2012; Ran et al., 2013). A especificidade da edição depende da pequena sequência do RNA-guia (20 nucleotídeos) que pode ser customizada para reconhecer qualquer sequência dentro do genoma.

Utilizamos uma sequência guia direcionada ao éxon 3 do gene que codifica a proteína p22<sup>phox</sup>(TGTCTGCTGGAGTATCCCCG), avaliada como um guia de alta qualidade (score 87). Esta sequência apresenta 112 potenciais sítios off-targets com baixa afinidade, sendo apenas 14 localizados em genes, como listado abaixo:

<b>Potenciais genes <i>off-targets</i>:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Canal de cloro ativado por cálcio</li> <li>• Culina 9</li> <li>• Domínio dependente de cálcio</li> <li>• Fator de fissão mitocondrial</li> <li>• Fator de transcrição AP-2 beta</li> <li>• Hexim 2</li> <li>• <i>Limb-bud and heart</i> (Lbh)</li> <li>• Proteína de ligação ao retinol</li> <li>• Proteína do transporte vesicular de aminas</li> <li>• Proteína nuclear 4</li> <li>• Proteína <i>Zinc-finger</i></li> <li>• Receptor olfativo</li> <li>• Ser/Thr quinase</li> <li>• Serina Protease 50</li> </ul>

A utilização desta ferramenta nos permitiu gerar clones de macrófagos murinos que apresentavam uma deleção de cerca de 20 nucleotídeos no éxon alvo o que resultou na ausência da expressão da proteína p22<sup>phox</sup> (confirmada por *Western blotting*). Em nossos experimentos nós observamos que os clones p22<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> quando estimulados com LPS + IFN $\gamma$  produziram menores quantidades de ROS e, em concordância com os resultados obtidos com a apocinina, não apresentaram aumento na formação de CLs evidenciando mais uma vez um papel de ROS produzidos pela ativação da NADPH oxidase na biogênese destas organelas. Nosso resultados não permitem afirmar qual complexo da NADPH oxidase expressa em macrófagos é responsável pelos efeitos observados. Tanto a NOX1 quanto a NOX2 são alvos da inibição pela apocinina e também tem seu funcionamento afetado pela deleção da proteína p22<sup>phox</sup>. Apesar de a NOX2 ser mais expressa e a principal fonte de ROS em fagócitos, a NOX1 pode contribuir de maneira importante visto que sua expressão, que normalmente é baixa em macrófagos não estimulados, é rapidamente induzida após o estímulo com LPS (Park et al., 2009)

As vias que associam o aumento na produção de ROS com o acúmulo de lipídios intracelulares tem sido alvo de intensa investigação. Níveis elevados de ROS têm sido considerado um dos fatores principais na promoção de lesões ateroscleróticas e na formação das chamadas “células espumosas” (macrófagos contendo vários CLs em seu citoplasma) (Dandona et al., 2007). A formação de células espumosas pode ser estimulada pela inibição do efluxo de colesterol através de transportadores como ABCA1 e ABCG1 (Yvan-Charvet et al., 2007) sendo ROS um dos principais fatores inibitórios do transporte através de transportadores ABC (Chen et al., 2007; Tavakoli e Asmis, 2012). Trabalhos utilizando LPS e outros ligantes de TLR provenientes de bactérias são capazes de inibir o efluxo de colesterol e promover o fenótipo de células espumosas (Castrillo et al., 2003; Kalayoglu e Byrne, 1998; Nicolaou et al., 2011). Concordemente, o LPS não é capaz de induzir CLs em células de camundongos da linhagem C3H/HeJ (mutantes de TLR4) ou em células tratadas com anticorpos contra CD14, demonstrando um papel central destes receptores no processo de formação de CLs induzidos por LPS (Pacheco et al., 2002).

Outro mecanismo proposto que pode explicar a associação entre produção de ROS e formação de CLs é mediado pela quimiocina MCP-1. Estudos anteriores demonstraram que a indução da expressão de MCP-1 ocorre em resposta ao aumento da produção de ROS e que diferentes moléculas antioxidantes são

capazes de inibir a produção deste mediador inflamatório em células de linhagem monocítica induzida pelo estímulo com LPS (Chen et al., 2004; Park et al., 2009; Peluso et al., 2010; Zhong et al., 2013). Em estudo prévio de nosso grupo foi demonstrado que o MCP-1 é um importante mediador da biogênese de CLs em macrófagos. No mesmo trabalho foi observado que MCP-1 recombinante é capaz de induzir diretamente a rápida biogênese de CLs em macrófagos por mecanismos dependentes de CCR2, PI3K e ERK1/2 cinase. Além disso, macrófagos peritoneais de animais MCP-1<sup>-/-</sup> submetidos a dois modelos de peritonite, CLP e injeção de LPS, não apresentam aumento na biogênese de CL como ocorre em animais selvagens (Pacheco et al., 2007).

Além da diminuição da biogênese de CLs, os macrófagos p22<sup>phox<sup>-/-</sup></sup> também mostraram ter reduzida capacidade de produção de NO em resposta ao estímulo com LPS+IFN $\gamma$ . Este efeito pode ser explicado pela atuação de ROS, não apenas como causador de dano oxidativo, mas também como moléculas capazes de ativar vias de sinalização celular (Genestra, 2007). Atualmente é amplamente conhecido que ROS é capaz de modular as vias de sinalização mediadas por NF- $\kappa$ B, fator de transcrição central na resposta inflamatória. Os efeitos de ROS sobre esta via podem levar a ativação ou inibição do complexo, dependendo do tipo celular e do estímulo (Morgan e Liu, 2011). Em macrófagos murinos estimulados por LPS, a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por ROS induz a degradação das proteínas repressores I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$  responsáveis por manter o complexo inativo no citoplasma (Mercurio et al., 1997). Esta ativação induz a transcrição de vários genes que participam na resposta inflamatória, inclusive a óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A regulação redox da expressão de iNOS em macrófagos e outros tipos celulares tem sido descrita em diversos trabalhos (Blesa et al., 2003; Lanone et al., 2005; Mendes et al., 2001; Prasanna et al., 2007). Além disso, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos reduzem a produção de NO induzida pelo estímulo com LPS em macrófagos via inibição de NF- $\kappa$ B, incluindo a apocinina (Han et al., 2001; Viačková et al., 2011). Nossos resultados reforçam a importância de ROS produzidas pela NOX na produção de NO em macrófagos estimulados com LPS + IFN $\gamma$ .

Em resumo, os dados expostos até aqui apontam que ROS, independente da sua origem na célula, participa das vias de indução da biogênese de CLs em macrófagos estimulados por LPS + IFN $\gamma$ . Entretanto, a importância relativa de cada fonte de ROS neste mecanismo é difícil de definir. Existe uma intensa interação entre as vias de produção de ROS mitocondriale citosólica (via NADPH oxidases).

Diferentes estudos apontam mecanismos pelos quais ROS de origem mitocondrial é capaz de ativar NADPH oxidases e mecanismos onde ROS/RNS de origem citosólica desencadeiam estresse oxidativo mitocondrial com consequente disfunção desta organela. No primeiro caso, podemos citar os modelos de hipóxia, farmacológicos ou genéticos, que classicamente induzem a formação de ROS de origem mitocondrial. Estudos preliminares demonstraram que ROS mitocondrial induzido pela hipóxia é capaz de induzir a atividade de NADPH oxidase (provavelmente NOX 1) via PKC $\epsilon$  (Rathore et al., 2008). Em modelos de privação de soro, a cinética de produção de ROS se inicia com uma produção rápida mediada pelas mitocôndrias seguida por uma condição de estresse oxidativo mais lenta e duradoura, dependente da ativação da NADPH oxidase (Seung et al., 2006). Em células da musculatura lisa vascular, a indução de disfunção mitocondrial moderada interrompe totalmente a ativação da NADPH oxidase induzida por angiotensina II, evidenciando neste caso a necessidade da integridade funcional das mitocôndrias para a eficiente ativação desta via (Wosniak et al., 2009).

No sentido inverso, em células endoteliais a sinalização de angiotensina II é capaz de ativar a NADPH oxidase, e pela subsequente produção de ROS induz a abertura de canais de potássio sensíveis a ATP levando à despolarização do potencial de membrana mitocondrial, aumento da formação de ROS e alteração na função respiratória (Brandes, 2005; Doughan et al., 2008). No contexto da sepse, Quoilin e colaboradores, observaram que a ativação de NOX4 ocorre antes da disfunção mitocondrial em células do epitélio tubular renal (HK-2) estimuladas com LPS. A rápida indução de NOX 4 associada à ativação de iNOS levam a formação de ânions superóxidos e NO, que combinados, geram peroxinitrito, apontado pelos autores como possível mediador da posterior disfunção mitocondrial (Quoilin et al., 2014). Em nosso modelo, a estimulação de macrófagos com LPS + IFN $\gamma$  induziram aumento da fluorescência, tanto de DHE quanto do mitoSox, já a partir de 30 min de estímulo o que não nos permite estabelecer uma relação de causa e consequência entre estresse oxidativo citosólico e mitocondrial.

Uma vez que durante o estímulo com LPS + IFN $\gamma$  foi observado aumento da produção de ROS, via ativação de NADPH oxidase e por via mitocondrial, e acúmulo de CLs no citoplasma das células, a pergunta seguinte foi se os componentes moleculares dos CLs estavam sofrendo danos oxidativos. Os resultados obtidos utilizando a sonda bodipy C11, demonstraram que neste modelo estas organelas acumulam lipídios peroxidados. Com as metodologias, usadas não podemos afirmar

se ocorre peroxidação *in situ* ou se os lipídios peroxidados são direcionados para os CLs de outros sítios celulares. Como evidência adicional, dosamos a formação de 8-isoprostano, um membro da classe F<sub>2</sub>-isoprostano. F<sub>2</sub>-Isoprostanos são compostos semelhantes às prostaglandinas, porém não dependem de oxidação enzimática, pois são gerados a partir da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidônico, ω6) pela ação de espécies reativas. São formados primeiramente *in situ*, esterificados em fosfolipídios e depois liberados pela ação de enzimas fosfolipases, como a PLA<sub>2</sub>. A quantificação de F<sub>2</sub>-isoprostanos tem sido apontada como o método mais apurado para avaliar o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica (Milatovic et al., 2011). Uma vez que os CLs são um importante reservatório de ácido araquidônico intracelular, fizemos as dosagens não apenas no sobrenadante das culturas, mas também diretamente do purificado de CLs. Em concordância com os dados de peroxidação lipídica, foi observado aumento na produção de 8-Isoprostano no purificado de CLs de células estimuladas com LPS + IFN $\gamma$ , entretanto o mesmo não ocorreu no purificado de CLs das células tratadas com antimicina A, possivelmente pela ativação diferenciada das vias de PLA<sub>2</sub>, o que precisará ser investigado.

No modelo *in vivo*, a avaliação ultraestrutural dos CLs demonstraram alterações na elétron-densidade dos CLs nas células do lavado peritoneal, e de forma mais drástica no tecido hepático de animais submetidos ao CLP. Alterações deste tipo têm sido descritas por nosso grupo em CLs de macrófagos durante doenças infecciosas *in vivo* (D'Avila et al., 2006; Melo et al., 2006) e apontadas na literatura como uma indicação direta da mudanças do conteúdo lipídico destas organelas, mais precisamente alterações na concentração de ácidos graxos poliinsaturados. Uma vez que o tetróxido de ósmio usado na preparação das amostras para MET se liga preferencialmente em ligações insaturadas dos ácidos graxos (Adams, et al., 1967; HAYES et al., 1963), quanto mais ácidos graxos poliinsaturados presentes, mais elétron-densos os CLs serão. Este fato foi demonstrado experimentalmente por Cheng e colaboradores, no seu trabalho eles adicionaram ao meio de cultura de fibroblastos, ácidos graxos poliinsaturados com diferentes números de insaturações ácido oléico (AO 18:1), ácido linoléico (LA 18:2) e o ácido docosahexaenóico (DHA 22:6) e posteriormente preparou as células para MET. Os resultados mostraram que os CLs das células tratadas com DHA eram mais elétron-densos, seguidos pelos das células tratadas com LA e por fim AO, em concordância com número de insaturações destes ácidos graxos (Cheng et al.,

2009). Desta forma, ao demonstrar aumento de elétron-densidade de CLs nossos resultados indicam alteração no seu conteúdo lipídico.

Alterações na composição dos CLs foram observadas previamente em situação de aumento do estresse oxidativo. Em 2015, ao estudar o desenvolvimento do sistema nervoso central de drosófilas, Baley e colaboradores observaram, por espectrometria de massas, que em ambiente de hipóxia o ROS gerado é capaz de induzir uma redistribuição dos ácidos graxos, incluindo ácidos graxos insaturados, dos fosfolipídios de membranas para os CLs, induzindo um aumento no número destas organelas por mecanismos dependentes de fosfolipase D, lipinas e DGAT1. Este redirecionamento é apontado pelos autores como um mecanismo de prevenção da formação de lipídios peroxidados. Utilizando a sonda *Bodipy C11* os autores demonstraram ainda que dentro dos CLs os ácidos graxos poliinsaturados estão mais protegidos da peroxidação lipídica do que quando associados às membranas. Em concordância, em células deficientes em *Lsd-2* (*Drosophila Lipid Storage Droplet 2* -proteína da família PAT em drosófilas), que apresentam a biogênese de CLs prejudicada, a peroxidação lipídica nas membranas é ainda maior. Assim os CLs forneceriam um ambiente de proteção que minimiza a reação em cadeia de peroxidação lipídica e a produção de intermediários lipídicos tóxicos, como o 4HNE, limitando danos oxidativos aos componentes celulares. Este papel antioxidante dos CLs protegeria não só as células da glia, como também células-tronco neuronais e sua progênie (Bailey et al., 2015).

Entretanto não há um consenso a esse respeito, outros trabalhos sugerem que os CLs podem conter lipídios peroxidados e até mesmo mediar danos lipotóxicos. No mesmo ano de 2015, Liu e colaboradores, estudando modelos de doenças neurodegenerativas desencadeadas por defeitos mitocondriais, observaram acúmulo de CLs em células da glia ocorrendo no início ou precedendo o processo de neurodegeneração tanto em drosófilas quanto em camundongos, de maneira dependente de ROS. Diferentes estratégias utilizadas, como tratamento com o antioxidante N-acetil cisteína, super expressão de hSOD ou lipase 4, bem como a deleção dos genes JNK ou SREBP resultaram simultaneamente na redução do acúmulo de CLs nas células da glia e na prevenção da neurodegeneração. Entretanto o simples acúmulo de CLs não foi suficiente para induzir a neurodegeneração neste modelo. Os autores demonstraram que a peroxidação dos lipídios presentes nos CLs decorrente do aumento dos níveis de ROS, gerado pela

disfunção mitocondrial, era de fato o mecanismo responsável pela morte neuronal (Liu et al., 2015).

Além das alterações no conteúdo lipídico, nossos resultados mostraram que as proteínas presentes nos CLs, especialmente aquelas associadas à monocamada de fosfolípidios (Kory et al., 2016), são suscetíveis a alterações decorrentes da ação de lipídios peroxidados. Por microscopia de fluorescência, macrófagos derivados de medula óssea estimulados com LPS + IFN $\gamma$  e células do lavado peritoneal de animais submetidos ao CLP mostraram intensa marcação referente à carbonilação de proteínas periféricas dos CLs. Resultados semelhantes foram observados no modelo de esteatose hepática de origem alcoólica onde, assim como na sepse, o estresse oxidativo está associado ao acúmulo de lipídios. O metabolismo do etanol induz aumento na produção de ROS por via mitocondrial e microssomal, este por sua vez é capaz de reagir com a abundante carga lipídica gerando lipídios peroxidados (Lieber, 2004; Tuma e Casey, 2003). Neste contexto, Orlicky e colaboradores demonstraram a presença de adutos de 4-HNE co-localizando com as proteínas da família PAT no fígado de animais submetidos à dieta suplementada com etanol, sugerindo que as proteínas da família PAT ou moléculas associadas encontradas na superfície dos CLs podem ser alvo de peroxidação lipídica (Orlicky et al., 2011). Ainda não se sabe qual o impacto destas modificações nas funções destas proteínas, principalmente aquelas relacionadas ao controle da lipólise. Os autores também destacaram que a distribuição espacial desta marcação de 4-HNE nas zonas do fígado se correlaciona com a de marcadores do estresse de RE, a calreticulina e a Grp78.

O papel da ativação da NADPH oxidase na indução das alterações oxidativas dos componentes lipídicos e proteicos dos CLs após o estímulo com LPS + IFN $\gamma$  ficou evidente, uma vez que o pré-tratamento, *in vitro*, com a apocinina previne-as. No que se refere a diminuição da peroxidação dos lipídios, o efeito da inibição da NADPH oxidase pela apocinina foi duplo, inibindo tanto a biogênese de CLs quanto a formação de ROS, evidenciando seu papel central neste mecanismo. No modelo de esteatose hepática induzida por etanol, camundongos *knockout* para enzimas do complexo NADPH oxidase apresenta diminuição, quase que completa, do acúmulo de lipídios no fígado prevenindo a lesão tecidual hepática (Kono et al., 2000). No modelo de sepse induzida por LPS, a inibição da ativação da NADPH oxidase pelo pré-tratamento com apocinina diminuiu a formação de intermediário lipídico tóxico produzidos a partir da peroxidação, como o HNE no soro, e o de malondialdeído no

tecido pulmonar de ratos (Abdelmageed et al., 2016; Kimura et al., 2005). No modelo de sepse pulmonar, a ativação da NADPH oxidase em macrófagos alveolares induz a peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas em células endoteliais da microvasculatura pulmonar induzindo a permeabilidade vascular. Experimentos utilizando o pré-tratamento com apocinina, ou macrófagos alveolares knockout para gp91<sup>phox-/-</sup> ou gp47<sup>phox-/-</sup> previnem estas alterações (Farley et al., 2009), além de reduzir o processo inflamatório e o dano no tecido pulmonar *in vivo* (Chian et al., 2012). Nestes contexto nossos resultados mostram o papel importante da ativação da NADPH oxidase nos danos celular e tecidual mediados pela peroxidação lipídica durante a sepse.

Uma vez que, além da ativação NADPH oxidase, a disfunção mitocondrial contribui de maneira importante com produção de ROS durante a sepse (Brealey et al., 2002; Crouser, 2004; Singer, 2013), um fator que poderia favorecer as alterações oxidativas nos componentes dos CLs seria a proximidade entre os CLs e mitocôndrias disfuncionais. A interação funcional e até mesmo estrutural entre CLs e mitocôndrias têm sido demonstradas em diversos tipos celulares sob diferentes condições (Blanchette-Mackie e Scow, 1983; Gao e Goodman, 2015; Goodman, 2008; Vilaro e Llobera, 1988). Em tecidos ditos oxidativos, como fígado, músculos esquelético e cardíaco, a proteína perilipina 5 (plin 5) tem sido apontada como a molécula responsável por recrutar mitocôndrias para a superfície dos CLs através de sua região C-terminal, além de ser capaz de regular a taxa lipólise nestes tecidos (Mason e Watt, 2015; Wang et al., 2011). Recentemente, experimentos utilizando fibroblastos sob estresse nutricional demonstrou que virtualmente todos os CLs observados estavam íntimamente associados às mitocôndrias, e que os ácidos graxos liberados pelo processo de lipólise eram entregues diretamente, pelo contato, dos CLs para o interior das mitocôndrias onde serviam de substrato para a beta oxidação (Rambold et al., 2015).

Em nossos resultados, observamos íntima associação entre CLs e mitocôndrias em macrófagos diferenciados de precursores de medula óssea estimulados com LPS+IFN $\gamma$  ou tratados com antimicina A *in vitro*, e também em macrófagos peritoneais e hepatócitos de camundongos submetidos ao CLP. Correlacionando esta observação aos resultados que demonstram que os componentes lipídicos e proteicos dos CLs apresentam alterações decorrentes de oxidação levantam-se questões importantes, por exemplo, será que as mitocôndrias disfuncionais induzem diretamente danos oxidativos ao componentes dos CLs? Em

contrapartida, será que os lipídios peroxidados presentes nos CLs produzem efeitos lipotóxicos sobre a maquinaria mitocondrial contribuindo para a disfunção ocorrida durante a sepse? Estas questões relevantes ainda necessitam de mais estudos para serem elucidadas. Nossos resultados mostraram maior frequência na interação entre CLs e mitocôndrias em macrófagos do lavado peritoneal de animais submetidos ao CLP, e de maneira interessante um aumento também de mitocôndrias morfológicamente alteradas envolvidas nesta interação. Apesar destas observações não estabelecerem uma relação causal entre a interação e o dano gerado, esta possibilidade não pode ser desconsiderada.

Visto que o fígado é um órgão central no controle da homeostase lipídica do organismo e sua fisiologia ser profundamente alterada durante a sepse (Nessler et al., 2012) resolvemos estudar também a biogênese de CLs, o dano tecidual e o envolvimento da NADPH oxidase nestes processos. Em nosso modelo experimental de sepse polimicrobiana *in vivo*, o CLP, nós observamos um intenso aumento do número de CLs no citoplasma dos hepatócitos, 24h após a cirurgia. Este aumento pode ser atribuído principalmente pelo aumento da síntese e captação de ácidos graxos pelo fígado e diminuição da beta-oxidação ocorrida em resposta ao processo infeccioso/inflamatório (Green et al., 2016). É amplamente conhecido que o LPS e várias citocinas pró-inflamatórias são capazes de induzir hipertrigliceridemia (Feingold et al., 1992; Hardardottir et al., 1994), aumentar a expressão de enzimas responsáveis pela síntese e captação de ácidos graxos pelo tecido hepático (Feingold et al., 1992, 1989; Memon et al., 1998), ao mesmo tempo que modulam negativamente os níveis de proteínas chave envolvidas na oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias, tais como a carnitina palmitoiltransferase 1A (CPT-1A) e a proteína de transporte de ácidos graxos (FATP-1)(Andrejko e Deutschman, 1997; Barke et al., 1996; Memon et al., 1998).

O envolvimento de ROS nas vias de sinalização que elevam o acúmulo de lipídios em células hepáticas tem sido proposto em diferentes estudos. Utilizando células da linhagem HepG2 observou-se que o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induz a biogênese de CLs via aumento da expressão e atividade de SREBP1c. SREBP1c é um importante fator de transcrição cujos genes alvos estão envolvidos na biosíntese de ácidos graxos, como ACC (*acetyl-CoA carboxylase*), FAS (*fatty acid synthase*) e SCD-1 (*Stearoyl-CoA desaturase-1*). Todos estes genes foram regulados positivamente após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sekiya et al., 2008). Concordemente, animais deficientes em SOD1 apresentam elevação de lipídios, incluindo TAG,

colesterol e NEFA tecido hepático. Este aumento ocorre em paralelo com o aumento da expressão de SREBP1 e SREBP2 (Hagiwara et al., 2012). Além disso, Lee e colaboradores, investigaram diferentes estímulos que induzem estresse oxidativo e alteram o metabolismo energético da célula, como por exemplo perda de DNAm, isquemia, hipóxia e CLP, em diferentes tipos celulares. Em todos estes modelos houve aumento na formação de CLs. No caso dos animais submetidos ao CLP os autores encontraram resultados semelhantes aos nossos ao perceber um grande aumento de CLs no citoplasma dos hepatócitos, efeito este dependente da enzima heme-oxigenase-1 (HO-1)(Lee et al., 2013).

Durante a sepse, o fígado atua na eliminação de endotoxinas bacterianas, desintoxicação e síntese de proteínas com funções metabólicas, imunológicas e na coagulação. Ainda não está claro se o aumento da lipogênese no fígado, favorece ou não a resposta do hospedeiro à infecção. É sabido que as lipoproteínas, principalmente o HDL tem a capacidade de se ligar e neutralizar LPS (Levels et al., 2001). No entanto, durante a sepse, quando os níveis de HDL diminuem, o LPS preferencialmente se liga ao VLDL produzido em grandes quantidades pelo fígado em resposta ao aumento na síntese de TAG (Kitchens e Thompson, 2003). O VLDL é o principal veículo de transporte do TAG sintetizado no fígado para os tecidos periféricos para utilização. A maior parte do TAG utilizados para a montagem de VLDL no hepatócito é mobilizado por lipólise de seus reservatório citosólico, os CLs, seguido por re-esterificação (Gibbons et al., 2004). Animais que têm a produção hepática de lipoproteínas prejudicada são mais susceptíveis à morte induzida por LPS (Feingold et al., 1995), enquanto aqueles que recebem infusão de lipoproteínas sobrevivem mais à sepse induzida pelo CLP (Read et al., 1995).

Em contrapartida, estudos recentes sugerem que o aumento da síntese e acúmulo de lipídios no tecido hepático induz injúria tecidual e favorece o processo inflamatório. Ao utilizar o tratamento com C75, uma pequena molécula inibidora da ácido graxo sintase, em camundongos submetidos ao CLP mostrou-se que a redução da lipogênese no tecido hepático reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias, a expressão de enzimas envolvidas nas síntese de mediadores inflamatórios como a iNOS e COX, diminui marcadores séricos de dano hepático e aumenta a sobrevivência dos animais. (Idrovo et al., 2016). Uma vez que também C75 estimula carnitina palmitoiltransferase 1, o benefício observado com o tratamento com C75 na sepse pode ser atribuído a inibições de lipogênese, bem como um aumento na oxidação dos ácidos graxos.

O estresse oxidativo é um importante componente indutor de dano hepático durante a sepse. Em ratos e camundongos, a injeção de LPS ou o modelo de CLP induzem a formação de ROS, tais como radicais ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxidos ( $ROO\cdot$ ), e RNS como o óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) no fígado (Hsu et al., 2006; Nowak et al., 1993; Singh e Li, 2012). Uma das hipóteses mais aceitas de como o estresse oxidativo contribui para o dano tecidual é através da peroxidação lipídica. No fígado os níveis de lipídios peroxidados, malondialdeído e hidroperóxidos se encontram elevados e correlacionam com aumento do processo inflamatório e necrose (Lomnitski et al., 2000; Singh e Li, 2012). Por isso, com o intuito de reduzir o dano tecidual hepático gerado durante a sepse, tem-se testado a eficácia de diferentes antioxidantes, e os resultados se mostraram animadores (Esteban-Zubero et al., 2016; Makled et al., 2016; Petronilho et al., 2016; Xu et al., 2014; Zhong et al., 2016).

Em nosso modelo *in vivo*, modulamos a gravidade do quadro séptico por alterar o número de furos feitos no ceco do animal durante a cirurgia de CLP. Conseqüentemente, com o aumento no número de furos, maior o aporte de fezes para a cavidade peritoneal, e mais grave a infecção polimicrobiana gerada. Dosagens bioquímicas das enzimas transaminases oxalacética, transaminase pirúvica e de albumina sérica, indicaram respectivamente o aumento do dano hepático e alterações na permeabilidade vascular nos grupos submetidos ao CLP em relação ao controle. Estas alterações se deram de forma ainda mais pronunciada no grupo sepse grave (9 furos no ceco) em comparação com o grupo sepse branda (2 furos no ceco), confirmando a diferença de gravidade do quadro entre os dois modelos. Paralelamente, a análise de crioseções do tecido hepático corados com bodipy mostrou aumento intenso do número de CLs nos animais submetidos ao CLP em relação ao grupo SHAM. De maneira interessante, comparando as imagens do grupo sepse branda (2 furos no ceco) com as do grupo sepse grave (9 furos no ceco), observamos claramente um aumento ainda maior neste último grupo, indicando uma correlação positiva entre a gravidade do quadro séptico e o aumento do acúmulo de CLs no tecido hepático.

Afim de avaliar a participação da NADPH oxidase na biogênese de CLs no tecido hepático de camundongos submetidos ao CLP, uma parcela dos animais do grupo sepse grave foi pré-tratada com apocinina 20mg/Kg, intraperitonealmente, 1h antes da cirurgia. Esta dose e via de administração foram escolhidas baseadas em um estudo prévio do grupo, onde a apocinina foi capaz de reverter a ativação de

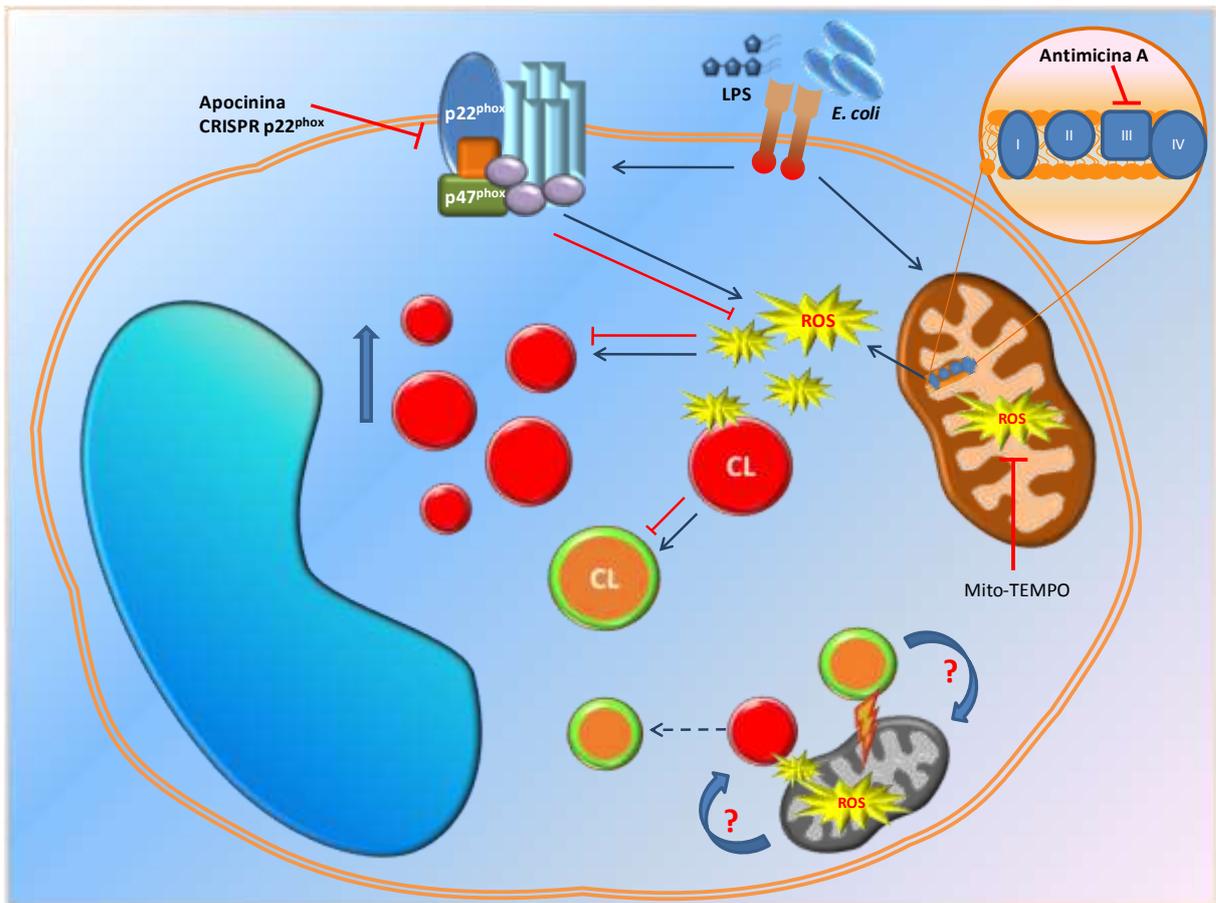
células da glia, o estresse oxidativo e formação de 4HNE no hipocampo e, a longo prazo, o desenvolvimento de dano cognitivo pós sepse (Hernandes et al., 2014). Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com apocinina nas condições utilizadas, apesar de uma tendência de diminuição, não reduziu significativamente o aumento na produção de 8-isoprostano na cavidade peritoneal ou os marcadores de lesão hepática. Esta diferença de resposta ao pré-tratamento em relação ao artigo citado pode estar associada ao modelo de CLP, que no artigo citado foi utilizado um modelo de sepse branda (2 furos), e no nosso experimento foi de sepse grave (9 furos), além de diferenças na linhagem do camundongo e tecido analisado.

Apesar do reconhecido papel de ROS e da peroxidação lipídica na lesão hepática durante a sepse, estudos relacionados especificamente com papel da NADPH oxidase neste contexto são escassos. No único artigo disponível na literatura até o momento que analisa o papel da apocinina sobre o dano hepático no modelo de sepse em ratos, a administrada via oral (na água, *ad libitum*) da apocinina ao longo de 8 dias antes do desafio com LPS não foi capaz de reverter significativamente a frequência e o grau da lesão hepática, após 24h (Lomnitski et al., 2000). Entretanto a inibição da NADPH oxidase pelo difenileno iodônio (DPI) foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica e injúria hepática induzida pela ativação neutrofílica, 7h após o desafio com LPS (Gujral et al., 2004). Para melhor avaliar os efeitos da apocinina sobre o dano hepático serão necessários experimentos variando a dose, via e frequência de administração da droga. Além disso experimentos utilizando animais *knockouts* para a enzima NADPH oxidase seriam fundamentais para estudar diretamente seu papel no acúmulo de CLs e na disfunção hepática durante a sepse *in vivo*.

Em suma (Figura 27), com o presente estudo nós identificamos uma associação entre o aumento da produção de ROS, independente da fonte celular, e a biogênese de CLs, e demonstramos que seu conteúdo lipídico e proteico sofrem alterações decorrentes de processos oxidativos. Além disso, nossos resultados apontam para um papel central da enzima NADPH oxidase nestes mecanismos. *In vivo*, nossos resultados mostram que a sepse experimental induz a biogênese de CLs, além de alterações oxidativas e ultraestruturais nesta organela. Nossas observações sugerem que os CLs podem mediar o dano celular, uma vez que as mitocôndrias em interação com os CLs durante a sepse apresentam mais frequentemente sinais de alterações ultraestruturais. Além disso, o aumento do número de CLs se deu em paralelo com aumento de marcadores de dano hepático

sendo ambos os efeitos acentuados dependendo da gravidade do modelo de sepse utilizado.

Entretanto o papel dos CLs em mediar dano celular e contribuir para a disfunção orgânica durante a sepse precisa ser melhor avaliada. Experimentos utilizando animais *knockouts* para a proteína estrutural ADRP, que tem a formação de CLs comprometida, poderiam ajudar a determinar a participação destas organelas em mediar o dano celular neste contexto. Outras questões que precisam ser melhor exploradas são: qual a importância da interação entre CLs e mitocôndrias nos danos oxidativos ao conteúdo lipídico e proteico dos CLs? E na disfunção mitocondrial ocorrida na sepse? Atualmente algumas das moléculas envolvidas em intermediar a interação CLs e mitocôndrias já foram descobertas, dentre elas a proteína plin 5. Estudos com animais *knockouts* ou o silenciamento desta proteína poderiam contribuir na resposta a estas questões.



**Figura 27: Representação esquemática das alterações na biologia dos CLs e consequente dano celular mediados por ROS na sepse.** Nossos resultados sugerem que o reconhecimento de componentes bacterianos induz aumento na produção de ROS por via mitocondrial e pela ativação do complexo enzimático da NADPH oxidase. O aumento na produção de ROS é capaz de induzir a biogênese de CLs e alterar seu conteúdo lipídico e proteico. A ativação da enzima NADPH oxidase é central neste mecanismo, uma vez que sua inibição farmacológica ou genética reverte estes efeitos. Nossos resultados também sugerem que os CLs têm potencial de exercer efeitos deletérios sobre componentes celulares incluindo a maquinaria mitocondrial podendo contribuir para os eventos de disfunção orgânica na sepse.

## 7 Conclusão:

- Estímulo com LPS+IFN $\gamma$  induz aumento na produção de ROS citoplasmático e mitocondrial que precedem temporalmente a biogênese de CLs em macrófagos
- A disfunção mitocondrial induzida pelo tratamento com antimicina A é capaz de induzir a biogênese de CLs em macrófagos.
- ROS de origem mitocondrial participa dos mecanismos envolvidos na biogênese de CLs induzidos pelo estímulo com LPS+IFN $\gamma$
- A formação de CLs em macrófagos estimulados com LPS+IFN $\gamma$  depende da ativação do complexo enzimático da NADPH oxidase.
- O conteúdo lipídico e protéico dos CLs sofre alterações decorrentes do processo oxidativo por mecanismos dependentes da atividade de NADPH oxidase.
- O modelo de sepse experimental *in vivo* induz aumento na formação de CLs e a modificação de suas proteínas em células do lavado peritoneal de camundongos.
- A sepse experimental induz alterações ultraestruturais nas mitocôndrias, mais frequentemente naquelas associadas aos CLs.
- Aumento na formação de CLs no fígado e alterações no metabolismo hepático ocorrem em paralelo e de maneira dependente da gravidade do modelo de sepse experimental utilizado.
- Alterações na elétron-densidade dos CLs no fígado indicam mudanças em seu conteúdo lipídico ao longo do tempo durante o quadro séptico.

## 8 Referências:

- Abdelmageed, M.E., El-Awady, M.S., Suddek, G.M., 2016. Apocynin ameliorates endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Int. Immunopharmacol.* 30, 163–170. doi:10.1016/j.intimp.2015.12.006
- Abraham, E., Singer, M., 2007. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit. Care Med.* 35, 2408–2416. doi:10.1097/SHK.0b013e31805816ef
- Accioly, M.T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C.M., Carrossini, N., Robbs, B.K., Oliveira, S.S., Kaufmann, C., Morgado-Diaz, J.A., Bozza, P.T., Viola, J.P.B., 2008. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res.* 68, 1732–1740. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1999
- Adams, C.W., Abdulla, Y.H. & Bayliss, O.B., 1967. Osmium tetroxide as a histochemical and histological reagent. [WWW Document]. *Histochimie*. URL [https://www.google.com.br/\\_/chrome/newtab?espv=2&ie=UTF-8](https://www.google.com.br/_/chrome/newtab?espv=2&ie=UTF-8)
- Aderem, a, Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787. doi:10.1038/35021228
- Alberti, C., Brun-Buisson, C., Burchardi, H., Martin, C., Goodman, S., Artigas, A., Sicignano, A., Palazzo, M., Moreno, R., Boulm??, R., Lepage, E., Le Gall, J., 2002. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.* 28, 108–121. doi:10.1007/s00134-001-1143-z
- Alvarez, H.M., Mayer, F., Fabritius, D., Steinbüchel, A., 1996. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Arch. Microbiol.* 165, 377–386. doi:10.1007/s002030050341
- Andersen, S.K., Gjedsted, J., Christiansen, C., Tønnesen, E., 2004. The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 75, 413–421. doi:10.1189/jlb.0503195
- Andrades, M., Ritter, C., De Oliveira, M.R., Streck, E.L., Fonseca Moreira, J.C., Dal-Pizzol, F., 2011. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: Role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. *J. Surg. Res.* 167, 307–313. doi:10.1016/j.jss.2009.08.005
- Andrades, M.E., Ritter, C., Dal-Pizzol, F., 2009. The role of free radicals in sepsis development. *Front. Biosci. (Elite Ed)*. 1, 277–87. doi:27 [pii]
- Andrades, M.E., Ritter, C., Dal-Pizzol, F., 2009. The role of free radicals in sepsis development. *Front. Biosci.* 1, 277–287. doi:27 [pii]
- Andrejko, K.M., Deutschman, C.S., 1997. Altered hepatic gene expression in fecal peritonitis: changes in transcription of gluconeogenic, beta-oxidative, and ureagenic genes. *Shock* 7, 164–169.
- Angus, D.C., Linde-Zwirble, W.T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., Pinsky, M.R., 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 29, 1303–1310. doi:10.1097/00003246-200107000-00002
- Angus, D.C., Wax, R.S., 2001. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit. Care Med.* 29, S109–S116. doi:10.1097/00003246-200107001-00035
- Aslani, B.A., Ghobadi, S., 2016. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci.* 146, 163–173.

doi:10.1016/j.lfs.2016.01.014

- Atal, C.K., Sharma, M.L., Kaul, A., Khajuria, A., 1986. Immunomodulating agents of plant origin. I: Preliminary screening. *J. Ethnopharmacol.* 18, 133–141. doi:10.1016/0378-8741(86)90025-5
- Babior, B.M., 2004. NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* doi:10.1016/j.coi.2003.12.001
- Babior, B.M., Curnutte, J.T., Kipnes, R.S., 1975. Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 85, 235–244. doi:0022-2143(75)90426-6 [pii]
- Babior, B.M., Kipnes, R.S., Curnutte, J.T., 1973. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52, 741–744. doi:10.1172/JCI107236
- Bailey, A.P., Koster, G., Guillermier, C., Hirst, E.M.A., MacRae, J.I., Lechene, C.P., Postle, A.D., Gould, A.P., 2015. Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of *Drosophila*. *Cell* 163, 340–353. doi:10.1016/j.cell.2015.09.020
- Bandeira-Melo, C., Phoofolo, M., Weller, P.F., 2001. Extranuclear Lipid Bodies, Elicited by CCR3-mediated Signaling Pathways, Are the Sites of Chemokine-enhanced Leukotriene C4 Production in Eosinophils and Basophils. *J. Biol. Chem.* 276, 22779–22787. doi:10.1074/jbc.M101436200
- Barbieri, S.S., Cavalca, V., Eligini, S., Brambilla, M., Caiani, A., Tremoli, E., Colli, S., 2004. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 156–165. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.020
- Barke, R.A., Birklid, S., Chapin, R.B., Roy, S., Brady, P.S., Brady, L.J., 1996. The effect of surgical treatment following peritoneal sepsis on hepatic gene expression. *J Surg Res* 60, 101–106. doi:S0022-4804(96)90017-7 [pii] 10.1006/jsre.1996.0017 [doi]
- Barnham, K.J., Masters, C.L., Bush, A.I., 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 205–214. doi:10.1038/nrd1330
- Barochia, A., Solomon, S., Cui, X., Natanson, C., Eichacker, P.Q., 2011. Eritoran tetrasodium (E5564) treatment for sepsis: review of preclinical and clinical studies. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 479–94. doi:10.1517/17425255.2011.558190
- Bartz, R., Li, W.-H., Venables, B., Zehmer, J.K., Roth, M.R., Welti, R., Anderson, R.G.W., Liu, P., Chapman, K.D., 2007a. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.* 48, 837–847. doi:10.1194/jlr.M600413-JLR200
- Bartz, R., Zehmer, J.K., Zhu, M., Chen, Y., Serrero, G., Zhao, Y., Liu, P., 2007b. Dynamic activity of lipid droplets: Protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J. Proteome Res.* 6, 3256–3265. doi:10.1021/pr070158j
- Battin, E.E., Brumaghim, J.L., 2009. Antioxidant activity of sulfur and selenium: A review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem. Biophys.* doi:10.1007/s12013-009-9054-7
- Bauer, S., Kirschning, C.J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., Lipford, G.B., 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A. 98, 9237–42. doi:10.1073/pnas.161293498

- Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- Beil, W.J., Weller, P.F., Peppercorn, M.A., Galli, S.J., Dvorak, A.M., 1995. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF-alpha in colonic Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* 58, 284–298.
- Beller, M., Riedel, D., Jansch, L., Dieterich, G., Wehland, J., Jäckle, H., Kühnlein, R.P., 2006. Characterization of the Drosophila lipid droplet subproteome. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1082–1094. doi:10.1074/mcp.M600011-MCP200
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316. doi:10.1074/jbc.272.33.20313
- Bickel, P.E., Tansey, J.T., Welte, M.A., 2009. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* doi:10.1016/j.bbailip.2009.04.002
- Blackwell, T.S., Christman, J.W., 1997. The Role of Nuclear Factor- $\kappa$  B in Cytokine Gene Regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 3–9. doi:10.1165/ajrcmb.17.1.f132
- Blanchette-Mackie, E.J., Scow, R.O., 1983. Movement of lipolytic products to mitochondria in brown adipose tissue of young rats: an electron microscope study. *J. Lipid Res.* 24, 229–244.
- Blesa, S., Cortijo, J., Mata, M., Serrano, A., Closa, D., Santangelo, F., Estrela, J.M., Suchankova, J., Morcillo, E.J., 2003. Oral N-acetylcysteine attenuates the rat pulmonary inflammatory response to antigen. *Eur. Respir. J.* 21, 394–400. doi:10.1183/09031936.03.00039602
- Boekstegers, P., Weidenhofer, S., Kapsner, T., Werdan, K., 1994. Skeletal muscle partial pressure of oxygen in patients with sepsis. *Crit. Care Med.* 22, 640–650.
- Bone, R.C., Balk, R. a., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, a. M., Knaus, W. a., Schein, R.M.H., Sibbald, W.J., 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest.* doi:10.1378/chest.101.6.1644
- Borrelli, E., Roux-Lombard, P., Grau, G.E., Girardin, E., Ricou, B., Dayer, J.-M., Suter, P.M., 1996. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit. Care Med.* 24. doi:10.1097/00003246-199603000-00006
- Bosma, M., Dapito, D.H., Drosatos-Tampakaki, Z., Huiping-Son, N., Huang, L.S., Kersten, S., Drosatos, K., Goldberg, I.J., 2014. Sequestration of fatty acids in triglycerides prevents endoplasmic reticulum stress in an in vitro model of cardiomyocyte lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841, 1648–1655. doi:10.1016/j.bbailip.2014.09.012
- Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B.R., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J., Nilsson, T., Borén, J., Olofsson, S.-O., 2007. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat. Cell Biol.* 9, 1286–1293. doi:10.1038/ncb1648
- Boulant, S., Montserret, R., Hope, R.G., Ratinier, M., Targett-Adams, P., Lavergne, J.-P., Penin, F., McLauchlan, J., 2006. Structural determinants that target the

- hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 281, 22236–22247. doi:10.1074/jbc.M601031200
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B., 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128, 617–30.
- Bozza, P.T., Bandeira-Melo, C., 2005. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation, in: *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz.* pp. 113–120. doi:10.1590/S0074-02762005000900020
- Bozza, P.T., Magalhães, K.G., Weller, P.F., 2009. Leukocyte lipid bodies—Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids* 1791, 540–551. doi:10.1016/j.bbalip.2009.01.005
- Bozza, P.T., Magalhães, K.G., Weller, P.F., 2009. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* doi:10.1016/j.bbalip.2009.01.005
- Bozza, P.T., Payne, J.L., Goulet, J.L., Weller, P.F., 1996. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J. Exp. Med.* 183, 1515–1525. doi:10.1084/jem.183.4.1515
- Bozza, P.T., Yu, W., Cassara, J., Weller, P.F., 1998. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J. Leukoc. Biol.* 64, 563–569.
- Bozza, P.T., Yu, W., Penrose, J.F., Morgan, E.S., Dvorak, A.M., Weller, P.F., 1997. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J. Exp. Med.* 186, 909–920. doi:10.1084/jem.186.6.909
- Brandes, R.P., 2005. Triggering mitochondrial radical release: A new function for NADPH oxidases. *Hypertension* 45, 847–848. doi:10.1161/01.HYP.0000165019.32059.b2
- Brandes, R.P., Weissmann, N., Schröder, K., 2014. Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* doi:10.1016/j.yjmcc.2014.02.006
- Brasaemle, D.L., 2007. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48, 2547–2559. doi:10.1194/jlr.R700014-JLR200
- Brasaemle, D.L., Barber, T., Wolins, N.E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E.J., Londos, C., 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38, 2249–2263.
- Brasaemle, D.L., Dolios, G., Shapiro, L., Wang, R., 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 46835–46842. doi:10.1074/jbc.M409340200
- Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., Davies, N. a., Cooper, C.E., Singer, M., 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 360, 219–223. doi:10.1016/S0140-6736(02)09459-X
- Briggs, R.T., Karnovsky, M.L., Karnovsky, M.J., 1977. Hydrogen peroxide production in chronic granulomatous disease. A cytochemical study of reduced pyridine nucleotide oxidases. *J. Clin. Invest.* 59, 1088–98. doi:10.1172/JCI108732
- Bussell, R., Eliezer, D., 2003. A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J. Mol. Biol.* 329,

763–778. doi:10.1016/s0022-2836(03)00520-5

- C., C., P.G., M., P., R.-L., D., B., S., H., S., L., J.-D., G., J.-M., D., B., R., 2004. Low apolipoprotein A-I level at intensive care unit admission and systemic inflammatory response syndrome exacerbation. *Crit. Care Med.* 32, 632–637.
- Cardona, P.J., Llatjos, R., Gordillo, S., Diaz, J., Ojanguren, I., Ariza, A., Ausina, V., 2000. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* 52, 156–163. doi:10.1046/j.1365-3083.2000.00763.x
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
- Castrillo, A., Joseph, S.B., Vaidya, S. a., Haberland, M., Fogelman, A.M., Cheng, G., Tontonoz, P., 2003. Crosstalk between LXR and Toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol. Cell* 12, 805–816. doi:10.1016/S1097-2765(03)00384-8
- Cermelli, S., Guo, Y., Gross, S.P., Welte, M.A., 2006. The Lipid-Droplet Proteome Reveals that Droplets Are a Protein-Storage Depot. *Curr. Biol.* 16, 1783–1795. doi:10.1016/j.cub.2006.07.062
- Chen, J.S., Greenberg, A.S., Wang, S.M., 2002. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Biochem.* 86, 784–791. doi:10.1002/jcb.10266
- Chen, M., Li, W., Wang, N., Zhu, Y., Wang, X., 2007. ROS and NF-kappaB but not LXR mediate IL-1beta signaling for the downregulation of ATP-binding cassette transporter A1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C1493-501. doi:10.1152/ajpcell.00016.2006
- Chen, X.-L., Zhang, Q., Zhao, R., Medford, R.M., 2004. Superoxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and iron are required for TNF-alpha-induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H1001–H1007. doi:10.1152/ajpheart.00716.2003
- Cheng, J., Fujita, A., Ohsaki, Y., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujimoto, T., 2009. Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. *Histochem. Cell Biol.* 132, 281–291. doi:10.1007/s00418-009-0615-z
- Chian, C.-F., Chiang, C.-H., Yuan-Jung, C., Chuang, C.-H., Liu, S.-L., Yi-Han, J., Zhang, H., Ryu, J.H., 2012. Apocynin attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Shock* 38, 196–202. doi:10.1097/SHK.0b013e31825a1982
- Chien, J.-Y., Jerng, J.-S., Yu, C.-J., Yang, P.-C., 2005. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit. Care Med.* 33, 1688–93. doi:10.1097/01.CCM.0000171183.79525.6B
- Cinel, I., Opal, S.M., 2009. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit. Care Med.* 37, 291–304. doi:10.1097/CCM.0b013e31819267fb
- Cohen, J., Vincent, J.L., Adhikari, N.K.J., Machado, F.R., Angus, D.C., Calandra, T., Jaton, K., Giulieri, S., Delaloye, J., Opal, S., Tracey, K., van der Poll, T., Pelfrene, E., 2015. Sepsis: A roadmap for future research. *Lancet Infect. Dis.* doi:10.1016/S1473-3099(15)70112-X

- COMMONER, B., TOWNSEND, J., PAKE, G.E., 1954. Free radicals in biological materials. *Nature* 174, 689–91.
- Cowley, H.C., Bacon, P.J., Goode, H.F., Webster, N.R., Jones, J.G., Menon, D.K., 1996a. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: A comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit. Care Med.* 24, 1179–1183.
- Cowley, H.C., Bacon, P.J., Goode, H.F., Webster, N.R., Jones, J.G., Menon, D.K., 1996b. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: A comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit. Care Med.* 24, 1179–1183. doi:10.1097/00003246-199607000-00019
- Crimi, E., Sica, V., Williams-Ignarro, S., Zhang, H., Slutsky, A.S., Ignarro, L.J., Napoli, C., 2006. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic. Biol. Med.* doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.054
- Crouser, E.D., 2004. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion* 4, 729–741. doi:10.1016/j.mito.2004.07.023
- Crouser, E.D., Julian, M.W., Blaho, D. V, Pfeiffer, D.R., 2002. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. *Crit. Care Med.* 30, 276–284. doi:10.1097/00003246-200202000-00002
- Crouser, E.D., Julian, M.W., Weisbrode, S.E., Dorinsky, P.M., 1997. Endotoxin-induced ileal VO<sub>2</sub>-DO<sub>2</sub> alterations do not correlate with the severity of ileal injury. *J. Crit. Care* 12, 83–91. doi:10.1016/S0883-9441(97)90005-8
- D'Avila, H., Freire-de-Lima, C.G., Roque, N.R., Teixeira, L., Barja-Fidalgo, C., Silva, A.R., Melo, R.C.N., DosReis, G.A., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., 2011. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E<sub>2</sub> generation and increased parasite growth. *J. Infect. Dis.* 204, 951–961. doi:10.1093/infdis/jir432
- D'Avila, H., Melo, R.C.N., Parreira, G.G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., 2006. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis In Vivo. *J. Immunol.* 176, 3087–3097. doi:10.4049/jimmunol.176.5.3087
- D'Avila, H., Melo, R.C.N., Parreira, G.G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., 2006. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J. Immunol.* 176, 3087–3097. doi:176/5/3087 [pii]
- Dalen, K.T., Dahl, T., Holter, E., Arntsen, B., Londos, C., Sztalryd, C., Nebb, H.I., 2007. LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1771, 210–227. doi:10.1016/j.bbalip.2006.11.011
- Dandona, P., Ghanim, H., Brooks, D.P., 2007. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. *J. Hypertens.* 25, 731–41. doi:10.1097/HJH.0b013e3280127948
- Dare, A.J., Phillips, A.R.J., Hickey, A.J.R., Mittal, A., Loveday, B., Thompson, N., Windsor, J.A., 2009. A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radic. Biol. Med.* doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.019
- Davies, M.J., 2005. The oxidative environment and protein damage. *Biochim.*

- Davies, M.J., Fu, S., Wang, H., Dean, R.T., 1999. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, in: *Free Radical Biology and Medicine*. pp. 1151–1163. doi:10.1016/S0891-5849(99)00206-3
- Deitch, E.A., 1992. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 216, 117–134. doi:10.1097/0000658-199208000-00002
- Dellinger, R.P., Levy, M.M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S.M., Sevransky, J.E., Sprung, C.L., Douglas, I.S., Jaeschke, R., Osborn, T.M., Nunnally, M.E., Townsend, S.R., Reinhart, K., Kleinpell, R.M., Angus, D.C., Deutschman, C.S., MacHado, F.R., Rubenfeld, G.D., Webb, S., Beale, R.J., Vincent, J.L., Moreno, R., 2013. Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. 39, 165–228. doi:10.1007/s00134-012-2769-8
- Diebold, B. a, Bokoch, G.M., 2001. Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat. Immunol.* 2, 211–215. doi:10.1038/85259
- Dikalova, A.E., Bikineyeva, A.T., Budzyn, K., Nazarewicz, R.R., McCann, L., Lewis, W., Harrison, D.G., Dikalov, S.I., 2010. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ. Res.* 107, 106–116. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.214601
- Dimopoulou, I., 2014. Adipose tissue lipolysis and circulating lipids in acute and subacute critical illness: effects of shock and treatment. *J. Crit. Care* 29. doi:10.1016/j.jcrc.2014.06.003
- Dinauer, M.C., Pierce, E.A., Bruns, G.A.P., Curnutte, J.T., Orkin, S.H., 1990. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 86, 1729–1737. doi:10.1172/JCI114898
- Doughan, A.K., Harrison, D.G., Dikalov, S.I., 2008. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: Linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ. Res.* 102, 488–496. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.162800
- Dröge, W., 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Dvorak, A.M., Morgan, E., Schleimer, R.P., Ryeom, S.W., Lichtenstein, L.M., Weller, P.F., 1992. Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 759–769. doi:10.1177/40.6.1316915
- Dvorak, A.M., Morgan, E.S., Weller, P.F., 2001. Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor to lipid bodies and secretory granules in human mast cells. *Histochem. J.* 33, 397–402. doi:10.1023/A:1013771827069
- Dvorak, A.M., Weller, P.F., Harvey, V.S., Morgan, E.S., Dvorak, H.F., 1993. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 101, 136–142. doi:10.1159/000236511
- Escames, G., López, L.C., Ortiz, F., López, A., García, J.A., Ros, E., Acuña-Castroviejo, D., 2007. Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by

- melatonin in septic mice. *FEBS J.* 274, 2135–2147. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05755.x
- Esteban-Zubero, E., Alatorre-Jiménez, M.A., López-Pingarrón, L., Reyes-Gonzales, M.C., Almeida-Souza, P., Cantín-Golet, A., Ruiz-Ruiz, F.J., Tan, D.-X., García, J.J., Reiter, R.J., 2016. Melatonin's role in preventing toxin-related and sepsis-mediated hepatic damage: A review. *Pharmacol. Res.* 105, 108–20. doi:10.1016/j.phrs.2016.01.018
- Esterbauer, H., Eckl, P., Ortner, A., 1990. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat. Res.* 238, 223–33. doi:10.1016/0165-1110(90)90014-3
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* doi:10.1016/0891-5849(91)90192-6
- Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872–879. doi:10.1016/S0899-9007(02)00916-4
- Farese, R. V., Walther, T.C., 2009. Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2009.11.005
- Fariss, M.W., Chan, C.B., Patel, M., Van Houten, B., Orrenius, S., 2005. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol. Interv.* 5, 94–111. doi:10.1124/mi.5.2.7
- Farley, K.S., Wang, L., Mehta, S., 2009. Septic pulmonary microvascular endothelial cell injury: role of alveolar macrophage NADPH oxidase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296, L480-8. doi:10.1152/ajplung.90201.2008
- Feingold, K.R., Funk, J.L., Moser, A.H., Shigenaga, J.K., Rapp, J.H., Grunfeld, C., 1995. Role for circulating lipoproteins in protection from endotoxin toxicity. *Infect. Immun.* 63, 2041–2046.
- Feingold, K.R., Shigenaga, J.K., Kazemi, M.R., McDonald, C.M., Patzek, S.M., Cross, A.S., Moser, A., Grunfeld, C., 2012. Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 92, 829–39. doi:10.1189/jlb.1111537
- Feingold, K.R., Soued, M., Serio, M.K., Moser, A.H., Dinarello, C.A., Grunfeld, C., 1989. Multiple cytokines stimulate hepatic lipid synthesis in vivo. *Endocrinology* 125, 267–274. doi:10.1210/endo-125-1-267
- Feingold, K.R., Staprans, I., Memon, R. a, Moser, a H., Shigenaga, J.K., Doerrler, W., Dinarello, C. a, Grunfeld, C., 1992. Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *J. Lipid Res.* 33, 1765–76.
- Feingold, K.R., Wang, Y., Moser, A., Shigenaga, J.K., Grunfeld, C., 2008. LPS decreases fatty acid oxidation and nuclear hormone receptors in the kidney. *J. Lipid Res.* 49, 2179–87. doi:10.1194/jlr.M800233-JLR200
- Fink, M.P., 2001. Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit. Care Clin.* 17, 219–237. doi:11219231
- Flaatten, H., 2004. Epidemiology of sepsis in Norway in 1999. *Crit. Care* 8, R180-4. doi:10.1186/cc2867
- Fowler, A. a, Syed, A. a, Knowlson, S., Sculthorpe, R., Farthing, D., DeWilde, C., Farthing, C. a, Larus, T.L., Martin, E., Brophy, D.F., Gupta, S., Fisher, B.J.,

- Natarajan, R., 2014. Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis. *J. Transl. Med.* 12, 32. doi:10.1186/1479-5876-12-32
- Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47, 412–426.
- Fujimoto, T., Kogo, H., Ishiguro, K., Tauchi, K., Nomura, R., 2001. Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new “membrane domain” in the cell. *J. Cell Biol.* 152, 1079–1085. doi:10.1083/jcb.152.5.1079
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y., 2008. Lipid droplets: A classic organelle with new outfits. *Histochem. Cell Biol.* doi:10.1007/s00418-008-0449-0
- Fujimoto, Y., Itabe, H., Sakai, J., Makita, M., Noda, J., Mori, M., Higashi, Y., Kojima, S., Takano, T., 2004. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1644, 47–59. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.10.018
- Galley, H.F., 2011. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br. J. Anaesth.* 107, 57–64. doi:10.1093/bja/aer093
- Galley, H.F., Davies, M.J., Webster, N.R., 1996. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit. Care Med.* 24, 1649–1653.
- Galley, H.F., Howdle, P.D., Walker, B.E., Webster, N.R., 1997. The effects of intravenous antioxidants in patients with septic shock. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 768–774.
- Gallin, J.I., Kaye, D., O’Leary, W.M., 1969. Serum Lipids in Infection. *N. Engl. J. Med.* 281, 1081–1086. doi:10.1056/NEJM196911132812001
- Gao, Q., Goodman, J.M., 2015. The lipid droplet—a well-connected organelle. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 49. doi:10.3389/fcell.2015.00049
- Gao, X., Standiford, T.J., Rahman, A., Newstead, M., Holland, S.M., Dinauer, M.C., Liu, Q., Malik, A.B., 2002. Role of NADPH oxidase in the mechanism of lung neutrophil sequestration and microvessel injury induced by Gram-negative sepsis: studies in p47phox<sup>-/-</sup> and gp91phox<sup>-/-</sup> mice. *J. Immunol.* 168, 3974–3982. doi:10.4049/jimmunol.168.8.3974
- Gattinoni, L., Brazzi, L., Pelosi, P., Latini, R., Tognoni, G., Pesenti, a, Fumagalli, R., 1995. A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. SvO<sub>2</sub> Collaborative Group. *N. Engl. J. Med.* 333, 1025–1032. doi:10.1056/NEJM199510193331601
- Genestra, M., 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.* doi:10.1016/j.cellsig.2007.04.009
- Gibbons, G.F., Wiggins, D., Brown, a-M., Hebbachi, a-M., 2004. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 59–64. doi:10.1042/BST0320059
- Gomberg, M., 1900. AN INSTANCE OF TRIVALENT CARBON: TRIPHENYLMETHYL. *J. Am. Chem. Soc.* 22, 757–771. doi:10.1021/ja02049a006
- Gomes, R.N., Bozza, F. a, Amâncio, R.T., Japiassú, A.M., Vianna, R.C.S., Larangeira, A.P., Gouvêa, J.M., Bastos, M.S., Zimmerman, G. a, Stafforini, D.M., Prescott, S.M., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., 2006a. Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in mice with systemic

- inflammatory response syndrome and sepsis. *Shock* 26, 41–9. doi:10.1097/01.shk.0000209562.00070.1a
- Gomes, R.N., Figueiredo, R.T., Bozza, F. a, Pacheco, P., Amâncio, R.T., Laranjeira, A.P., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., Bozza, M.T., 2006b. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock* 26, 457–63. doi:10.1097/01.shk.0000228801.56223.92
- Goode, H.F., Cowley, H.C., Walker, B.E., Howdle, P.D., Webster, N.R., 1995. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit. Care Med.* 23, 646–651.
- Goodman, J.M., 2008. The gregarious lipid droplet. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.R800042200
- Green, P., Theilla, M., Singer, P., 2016. Lipid metabolism in critical illness. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 19, 111–115. doi:10.1097/MCO.0000000000000253
- Greenberg, A.S., Egan, J.J., Wek, S.A., Garty, N.B., Blanchette-Mackie, E.J., Londos, C., 1991. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* 266, 11341–11346.
- Griguer, C.E., Oliva, C.R., Kelley, E.E., Giles, G.I., Lancaster, J.R., Gillespie, G.Y., 2006. Xanthine oxidase-dependent regulation of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res.* 66, 2257–2263. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3364
- Grillitsch, K., Connerth, M., Köfeler, H., Arrey, T.N., Rietschel, B., Wagner, B., Karas, M., Daum, G., 2011. Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: Lipidome meets Proteome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 1165–1175. doi:10.1016/j.bbalip.2011.07.015
- Grimsrud, P.A., Xie, H., Griffin, T.J., Bernlohr, D.A., 2008. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.R700019200
- Groemping, Y., Rittinger, K., 2005. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.* 386, 401–416. doi:10.1042/BJ20041835
- Grune, T., Merker, K., Sandig, G., Davies, K.J.A., 2003. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/S0006-291X(03)00809-X
- Gujral, J.S., Hinson, J.A., Farhood, A., Jaeschke, H., 2004. NADPH oxidase-derived oxidant stress is critical for neutrophil cytotoxicity during endotoxemia. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 287, G243–G252. doi:10.1152/ajpgi.00287.2003
- Guo, L., Ai, J., Zheng, Z., Howatt, D.A., Daugherty, A., Huang, B., Li, X.A., 2013. High density lipoprotein protects against polymicrobe-induced sepsis in mice. *J. Biol. Chem.* 288, 17947–17953. doi:10.1074/jbc.M112.442699
- Gupta, S., Jonas, M., 2006. Sepsis, septic shock and multiple organ failure. *Anaesth. Intensive Care Med.* 7, 143–146. doi:10.1383/anes.2006.7.5.143
- Hagiwara, A., Cornu, M., Cybulski, N., Polak, P., Betz, C., Trapani, F., Terracciano, L., Heim, M.H., Rüegg, M.A., Hall, M.N., 2012. Hepatic mTORC2 activates glycolysis and lipogenesis through Akt, glucokinase, and SREBP1c. *Cell Metab.* 15, 725–738. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.015

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14. doi:10.1016/j.siny.2010.04.003
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E., 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 119, 598–620. doi:0022-2143(92)90284-R [pii]
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine, Free Radical Biology and Medicine.* doi:10.1016/0891-5849(91)90055-8
- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231–55. doi:10.1038/sj.bjp.0705776
- Han, Y.J., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Lee, S.K., Simmons, R.L., Billiar, T.R., Kim, Y.M., 2001. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-kappa B activation: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Nitric Oxide* 5, 504–13. doi:10.1006/niox.2001.0367
- Hardardottir, I., Grunfeld, C., Feingold, K.R., 1994. Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 5, 207–215.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099–103. doi:10.1038/35074106
- Hayes, M.A., Timmins, A.C., Yau, E.H., Palazzo, M., Hinds, C.J., Watson, D., 1994. Elevation of systemic oxygen delivery in the treatment of critically ill patients. *N. Engl. J. Med.* 330, 1717–22. doi:10.1056/NEJM199406163302404
- HAYES, T.L., LINDGREN, F.T., GOFMAN, J.W., 1963. A QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE OSMIUM TETROXIDE-LIPOPROTEIN. *J. Cell Biol.* 19, 251–255. doi:10.1083/jcb.19.1.251
- Herms, A., Bosch, M., Ariotti, N., Reddy, B.J.N., Fajardo, A., Fernández-Vidal, A., Alvarez-Guaita, A., Fernández-Rojo, M.A., Rentero, C., Tebar, F., Enrich, C., Geli, M.I., Parton, R.G., Gross, S.P., Pol, A., 2013. Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. *Curr. Biol.* 23, 1489–1496. doi:10.1016/j.cub.2013.06.032
- Hernandes, M.S., D Avila, J.C., Trevelin, S.C., Reis, P. a, Kinjo, E.R., Lopes, L.R., Castro-Faria-Neto, H.C., Cunha, F.Q., Britto, L.R., Bozza, F. a, 2014. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. *J. Neuroinflammation* 11, 36. doi:10.1186/1742-2094-11-36
- Heumüller, S., Wind, S., Barbosa-Sicard, E., Schmidt, H.H.H.W., Busse, R., Schröder, K., Brandes, R.P., 2008. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 51, 211–217. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100214
- Hodges, B.D.M., Wu, C.C., 2010. Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *J. Lipid Res.* 51, 262–273. doi:10.1194/jlr.R003582
- Hordijk, P.L., 2006. Regulation of NADPH oxidases: The role of Rac proteins. *Circ. Res.* doi:10.1161/01.RES.0000204727.46710.5e
- Hotchkiss, R.S., Karl, I.E., 2003. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis — *NEJM.* *N. Engl. J. Med.* 348, 138–150. doi:10.1056/NEJMra021333
- Hotchkiss, R.S., Swanson, P.E., Freeman, B.D., Tinsley, K.W., Cobb, J.P.,

- Matuschak, G.M., Buchman, T.G., Karl, I.E., 1999. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* 27, 1230–51.
- Hsu, D.-Z., Chen, K.-T., Li, Y.-H., Chuang, Y.-C., Liu, M.-Y., 2006. Sesamol delays mortality and attenuates hepatic injury after cecal ligation and puncture in rats: role of oxidative stress. *Shock* 25, 528–32. doi:10.1097/01.shk.0000209552.95839.43
- Idrovo, J.P., Yang, W.-L., Jacob, A., Corbo, L., Nicastro, J., Coppa, G.F., Wang, P., 2016. Inhibition of lipogenesis reduces inflammation and organ injury in sepsis. *J. Surg. Res.* 200, 242–9. doi:10.1016/j.jss.2015.06.059
- James, A.M., Murphy, M.P., 2002. How mitochondrial damage affects cell function. *J. Biomed. Sci.* 9, 475–87. doi:64721
- Janeway, C. a, Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–21. doi:10.1126/science.1225829
- Johnson, A.C.M., Stahl, A., Zager, R.A., 2005. Triglyceride accumulation in injured renal tubular cells: Alterations in both synthetic and catabolic pathways. *Kidney Int.* 67, 2196–2209. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00325.x
- Jönsson, T.J., Johnson, L.C., Lowther, W.T., 2009. Protein engineering of the quaternary sulfiredoxin-peroxiredoxin enzyme-substrate complex reveals the molecular basis for cysteine sulfinic acid phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 284, 33305–33310. doi:10.1074/jbc.M109.036400
- Juntilla, M.M., Patil, V.D., Calamito, M., Joshi, R.P., Birnbaum, M.J., Koretzky, G.A., 2010. AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. *Blood* 115, 4030–4038. doi:10.1182/blood-2009-09-241000
- Kakinuma, K., Yamaguchi, T., Shimada, K., Sato, N., 1980. Comparative studies on alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes. III. Difference spectra of their cellular and subcellular fractions. *J Biochem* 88, 1467–1474.
- Kalayoglu, M. V., Byrne, G.I., 1998. A *Chlamydia pneumoniae* component that induces macrophage foam cell formation is chlamydial lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 66, 5067–5072.
- Kalyanaraman, B., Dranka, B.P., Hardy, M., Michalski, R., Zielonka, J., 2014. HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes - The ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.008
- Kamiński, M.M., R??th, D., Krammer, P.H., G??low, K., 2013. Mitochondria as oxidative signaling organelles in T-cell activation: Physiological role and pathological implications. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* doi:10.1007/s00005-013-0235-0
- Kawahara, T., Ritsick, D., Cheng, G., Lambeth, J.D., 2005. Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J. Biol. Chem.* 280, 31859–69. doi:10.1074/jbc.M501882200
- Khadori, R., Castillo, D., 2012. Endocrine and metabolic changes during sepsis: An

- update. *Med. Clin. North Am.* doi:10.1016/j.mcna.2012.09.005
- Khovidhunkit, W., Kim, M.S., Memon, R.A., Shigenaga, J.K., Moser, A.H., Feingold, K.R., Grunfeld, C., 2004. Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* 45, 1169–1196.
- Kimura, H., Liu, S., Yamada, S., Uchida, K., Matsumoto, K., Mukaida, M., Yoshida, K., 2005. Rapid increase in serum lipid peroxide 4-hydroxynonenal (HNE) through monocyte NADPH oxidase in early endo-toxemia. *Free Radic Res* 39, 845–851. doi:10.1080/10715760500161546
- Kitchens, R.L., Thompson, P. a, 2003. Impact of sepsis-induced changes in plasma on LPS interactions with monocytes and plasma lipoproteins: roles of soluble CD14, LBP, and acute phase lipoproteins. *J. Endotoxin Res.* 9, 113–118. doi:10.1179/096805103125001504
- Klein, S., Peters, E.J., Shangraw, R.E., Wolfe, R.R., 1991. Lipolytic response to metabolic stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 19, 776–779.
- Kono, H., Rusyn, I., Yin, M., Gäbele, E., Yamashina, S., Dikalova, A., Kadiiska, M.B., Connor, H.D., Mason, R.P., Segal, B.H., Bradford, B.U., Holland, S.M., Thurman, R.G., 2000. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J. Clin. Invest.* 106, 867–872. doi:10.1172/JCI9020
- Kory, N., Farese, R. V., Walther, T.C., 2016. Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends Cell Biol.* xx, 1–12. doi:10.1016/j.tcb.2016.02.007
- KREYMANN, G., GROSSER, S., BUGGISCH, P., GOTTSCHALL, C., MATTHAEI, S., GRETEN, H., 1993. Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Crit. Care Med.* 21, 1012–1019. doi:10.1097/00003246-199307000-00015
- Krishna, M.C., Russo, A., Mitchell, J.B., Goldstein, S., Dafni, H., Samuni, A., 1996. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O<sub>2</sub><sup>-</sup> or as SOD mimics? *J. Biol. Chem.* 271, 26026–26031. doi:10.1074/jbc.271.42.26026
- Kuramoto, K., Okamura, T., Yamaguchi, T., Nakamura, T.Y., Wakabayashi, S., Morinaga, H., Nomura, M., Yanase, T., Otsu, K., Usuda, N., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T., Kojima, Y., Hashimoto, T., Sakai, F., Hirose, F., Osumi, T., 2012. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. *J. Biol. Chem.* 287, 23852–63. doi:10.1074/jbc.M111.328708
- Kwon, J., Lee, S.-R., Yang, K.-S., Ahn, Y., Kim, Y.J., Stadtman, E.R., Rhee, S.G., 2004. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16419–24. doi:10.1073/pnas.0407396101
- L.B., W., J.P., F., A.K., M., L.J., R., 2010. Lipid peroxidation as measured by plasma levels of isoprostanes and isofurans is associated with organ failure in severe sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189. doi:10.1038/nri1312
- Lambeth, J.D., Neish, A.S., 2014. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu Rev Pathol* 9, 119–145. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104651

- Lang, C.H., 1992. Sepsis-induced insulin resistance in rats is mediated by a beta-adrenergic mechanism. *Am. J. Physiol.* 263, E703-11.
- Lanone, S., Bloc, S., Foresti, R., Almolki, A., Taille, C., Callebert, J., Conti, M., Goven, D., Aubier, M., Dureuil, B., El-Benna, J., Motterlini, R., Boczkowski, J., 2005. Bilirubin decreases nos2 expression via inhibition of NAD(P)H oxidase: implications for protection against endotoxic shock in rats. *FASEB J* 19, 1890–1892. doi:10.1096/fj.04-2368fje
- Large, V., Arner, P., 1998. Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab* 24, 409–418. doi:MDOI-DM-12-1998-24-5-1262-3636-101019-ART89 [pii]
- Leber, R., Zinser, E., Zellnig, G., Paltauf, F., Daum, G., 1994. Characterization of lipid particles of the yeast; *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1421–1428. doi:10.1002/yea.320101105
- Lee, S.-J., Zhang, J., Choi, A.M.K., Kim, H.P., 2013. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 327167. doi:10.1155/2013/327167
- Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., Rhee, S.G., 2002. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 277, 20336–20342. doi:10.1074/jbc.M111899200
- Leite, M.S., Pacheco, P., Gomes, R.N., Guedes, A.T., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., Koatz, V.L.G., 2005. Mechanisms of Increased Survival After Lipopolysaccharide-Induced Endotoxic Shock in Mice Consuming Olive Oil-Enriched Diet. *Shock* 23, 173–178. doi:10.1097/01.shk.0000148072.12094.77
- Lekkou, A., Mouzaki, A., Siagris, D., Ravani, I., Gogos, C.A., 2014. Serum lipid profile, cytokine production, and clinical outcome in patients with severe sepsis. *J. Crit. Care* 29, 723–727. doi:10.1016/j.jcrc.2014.04.018
- Leslie, N.R., Bennett, D., Lindsay, Y.E., Stewart, H., Gray, A., Downes, C.P., 2003. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J.* 22, 5501–5510. doi:10.1093/emboj/cdg513
- Levels, J.H., Abraham, P.R., van den Ende, A., van Deventer, S.J., 2001. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect. Immun.* 69, 2821–8. doi:10.1128/IAI.69.5.2821-2828.2001
- Levy, B., Gibot, S., Franck, P., Cravoisy, A., Bollaert, P.E., 2005. Relation between muscle Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup> ATPase activity and raised lactate concentrations in septic shock: A prospective study. *Lancet* 365, 871–875. doi:10.1016/S0140-6736(05)71045-X
- Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.L., Ramsay, G., 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 31, 1250–1256. doi:10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B
- Lieber, C.S., 2004. Alcoholic fatty liver: Its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis, in: *Alcohol.* pp. 9–19. doi:10.1016/j.alcohol.2004.07.008
- Lim, K.G., Wan, H.C., Bozza, P.T., Resnick, M.B., Wong, D.T., Cruikshank, W.W., Kornfeld, H., Center, D.M., Weller, P.F., 1996. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J. Immunol.* 156, 2566–70.
- Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R. V, Ory, D.S., Schaffer,

- J.E., 2003. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3077–3082. doi:10.1073/pnas.0630588100
- Liu, L., Trent, C.M., Fang, X., Son, N.H., Jiang, H., Blaner, W.S., Hu, Y., Yin, Y.X., Farese, R. V., Homma, S., Turnbull, A. V., Eriksson, J.W., Hu, S.L., Ginsberg, H.N., Huang, L.S., Goldberg, I.J., 2014. Cardiomyocyte-specific loss of diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) reproduces the abnormalities in lipids found in severe heart failure. *J. Biol. Chem.* 289, 29881–29891. doi:10.1074/jbc.M114.601864
- Liu, L., Zhang, K., Sandoval, H., Yamamoto, S., Jaiswal, M., Sanz, E., Li, Z., Hui, J., Graham, B.H., Quintana, A., Bellen, H.J., 2015. Glial Lipid Droplets and ROS Induced by Mitochondrial Defects Promote Neurodegeneration. *Cell* 160, 177–190. doi:10.1016/j.cell.2014.12.019
- Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D.I., Zhu, M., Anderson, R.G.W., 2004. Chinese Hamster Ovary K2 Cell Lipid Droplets Appear to be Metabolic Organelles Involved in Membrane Traffic. *J. Biol. Chem.* 279, 3787–3792. doi:10.1074/jbc.M311945200
- Lomnitski, L., Nyska, B., Ben-Shaul, V., Maronpot, R.R., Haseman, J.K., Harrus, T.L., Bergman, M., Grossman, S., 2000. Effects of antioxidants apocynin and the natural water-soluble antioxidant from spinach on cellular damage induced by lipopolysaccharide in the rat. *Toxicol. Pathol.* 28, 580–587. doi:10.1177/019262330002800412
- Lowes, D.A., Thottakam, B.M. V, Webster, N.R., Murphy, M.P., Galley, H.F., 2008. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against organ damage in a lipopolysaccharide-peptidoglycan model of sepsis. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1559–1565. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.003
- Lowes, D.A., Webster, N.R., Murphy, M.P., Galley, H.F., 2013. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br. J. Anaesth.* 110, 472–480. doi:10.1093/bja/aes577
- Lu, X., Gruia-Gray, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Londos, C., Kimmel, A.R., 2001. The murine perilipin gene: The lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm. Genome* 12, 741–749. doi:10.1007/s00335-01-2055-5
- Luchtemberg, M.N., Petronilho, F., Constantino, L., Gelain, D.P., Andrades, M., Ritter, C., Moreira, J.C.F., Streck, E.L., Dal-Pizzol, F., 2008. Xanthine oxidase activity in patients with sepsis. *Clin. Biochem.* 41, 1186–1190. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.07.015
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016
- Macdonald, J., Galley, H.F., Webster, N.R., 2003. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br. J. Anaesth.* 90, 221–232. doi:10.1093/bja/aeg034
- Macfarlane, D.P., Forbes, S., Walker, B.R., 2008. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: Fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J. Endocrinol.* doi:10.1677/JOE-08-0054
- Makled, M.N., El-Awady, M.S., Abdelaziz, R.R., Atwan, N., Guns, E.T., Gameil, N.M.,

- Shehab El-Din, A.B., Ammar, E.M., 2016. Pomegranate protects liver against cecal ligation and puncture-induced oxidative stress and inflammation in rats through TLR4/NF- $\kappa$ B pathway inhibition. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 43, 182–92. doi:10.1016/j.etap.2016.03.011
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424, 83–95. doi:10.1016/S0027-5107(99)00010-X
- Marnett, L.J., 2002. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 181–182, 219–222. doi:10.1016/S0300-483X(02)00448-1
- Martin, S., Parton, R.G., 2006a. a Dynamic Organelle. *Mol. Cell* 7, 373–378. doi:10.1038/nrm1912
- Martin, S., Parton, R.G., 2006b. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 373–378. doi:10.1038/nrm1912
- Mason, R.R., Watt, M.J., 2015. Unraveling the roles of PLIN5: Linking cell biology to physiology. *Trends Endocrinol. Metab.* doi:10.1016/j.tem.2015.01.005
- Masuda, Y., Itabe, H., Odaki, M., Hama, K., Fujimoto, Y., Mori, M., Sasabe, N., Aoki, J., Arai, H., Takano, T., 2006. ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *J. Lipid Res.* 47, 87–98. doi:10.1194/jlr.M500170-JLR200
- McDonald, M.C., Dhady, P., Cockerill, G.W., Cuzzocrea, S., Mota-Filipe, H., Hinds, C.J., Miller, N.E., Thiemermann, C., 2003. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock* 20, 551–7. doi:10.1097/01.shk.0000097249.97298.a3
- McGookey, D.J., Anderson, R.G., 1983. Morphological characterization of the cholesteryl ester cycle in cultured mouse macrophage foam cells. *J. Cell Biol.* 97, 1156–1168.
- Melo, R.C.N., Ávila, H.D., Fabrino, D.L., Almeida, P.E., Bozza, P.T., 2003. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: Putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* 35, 59–67. doi:10.1016/S0040-8166(02)00105-2
- Melo, R.C.N., D'Avila, H., Wan, H.-C., Bozza, P.T., Dvorak, A.M., Weller, P.F., 2011. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 59, 540–556. doi:10.1369/0022155411404073
- Melo, R.C.N., Fabrino, D.L., Dias, F.F., Parreira, G.G., 2006. Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm. Res.* 55, 342–348. doi:10.1007/s00011-006-5205-0
- Melo, R.C.N., Sabban, A., Weller, P.F., 2006. Leukocyte lipid bodies: inflammation-related organelles are rapidly detected by wet scanning electron microscopy. *J. Lipid Res.* 47, 2589–2594. doi:10.1194/jlr.D600028-JLR200
- Memon, R. a, Feingold, K.R., Moser, a H., Fuller, J., Grunfeld, C., 1998. Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines. *Am. J. Physiol.* 274, E210-7.
- Mendes, a F., Carvalho, a P., Caramona, M.M., Lopes, M.C., 2001. Diphenyleiodonium inhibits NF-kappaB activation and iNOS expression induced by IL-1beta: involvement of reactive oxygen species. *Mediators Inflamm.* 10, 209–215. doi:10.1080/09629350120080401
- Mercurio, F., Sci, J.C., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J.,

- Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., Rao, A., 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinases essential for NF- $\kappa$ B activation. *Science* (80- ). 278, 860–6. doi:10.1126/science.278.5339.860
- Mesquita-Santos, F.P., Vieira-de-Abreu, A., Calheiros, A.S., Figueiredo, I.H., Castro-Faria-Neto, H.C., Weller, P.F., Bozza, P.T., Diaz, B.L., Bandeira-Melo, C., 2006. Cutting edge: prostaglandin D2 enhances leukotriene C4 synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic in vivo role of endogenous eotaxin. *J. Immunol.* 176, 1326–1330. doi:176/3/1326 [pii]
- Michie, H.R., 1996. Metabolism of sepsis and multiple organ failure. *World J. Surg.* doi:10.1007/s002689900072
- Milatovic, D., Montine, T.J., Aschner, M., 2011. Measurement of isoprostanes as markers of oxidative stress. *Methods Mol. Biol.* 758, 195–204. doi:10.1007/978-1-61779-170-3\_13
- Miura, S., Gan, J.W., Brzostowski, J., Parisi, M.J., Schultz, C.J., Londos, C., Oliver, B., Kimmel, A.R., 2002. Functional conservation for lipid storage droplet association among perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 277, 32253–32257. doi:10.1074/jbc.M204410200
- Morgan, M.J., Liu, Z., 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res.* 21, 103–15. doi:10.1038/cr.2010.178
- Murphy, D.J., 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* doi:10.1016/S0163-7827(01)00013-3
- Murphy, D.J., 2012. The dynamic roles of intracellular lipid droplets: From archaea to mammals. *Protoplasma.* doi:10.1007/s00709-011-0329-7
- Nanduri, J., Vaddi, D.R., Khan, S.A., Wang, N., Makerenko, V., Prabhakar, N.R., 2013. Xanthine Oxidase Mediates Hypoxia-Inducible Factor-2?? Degradation by Intermittent Hypoxia. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0075838
- Nayernia, Z., Jaquet, V., Krause, K.H., 2014. New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal* 20, 2815–2837. doi:10.1089/ars.2013.5703
- Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C., Salvayre, R., 2008. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 153, 6–20. doi:10.1038/sj.bjp.0707395
- Nessler, N., Launey, Y., Aninat, C., Morel, F., Mallédant, Y., Seguin, P., 2012. Clinical review: The liver in sepsis. *Crit. Care* 16, 235. doi:10.1186/cc11381
- Ngaosuwan, K., Houngngam, N., Limpisook, P., Plengpanich, W., Khovidhunkit, W., 2015. Apolipoprotein A-V is not a major determinant of triglyceride levels during human sepsis. *J. Crit. Care* 30, 727–31. doi:10.1016/j.jcrc.2015.03.026
- Nicolaou, G., Goodall, A.H., Erridge, C., 2011. Diverse Bacteria Promote Macrophage Foam Cell Formation Via Toll-Like Receptor-Dependent Lipid Body Biosynthesis. *J Atheroscler Thromb* 137–148. doi:10.5551/jat.10249
- Noble, J.S., MacKirby, F.N., Donaldson, S.I., Howie, J.C., 2001. Renal and respiratory failure in Scottish ICUs. *Anaesthesia* 56, 124–129. doi:10.1046/j.1365-2044.2001.01841.x
- Norbury, W.B., Jeschke, M.G., Herndon, D.N., 2007. Metabolism modulators in sepsis: propranolol. *Crit. Care Med.* 35, S616-20.

doi:10.1097/01.CCM.0000278599.30298.80

- Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* doi:10.1016/S0891-5849(01)00724-9
- Nowak, D., Pietras, T., Antczak, A., Krol, M., Piasecka, G., 1993. Effect of bacterial lipopolysaccharide on the content of lipid peroxidation products in lungs and other organs of mice. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63, 77–83.
- Ogilvie, A.C., Groeneveld, A.B., Straub, J.P., Thijs, L.G., 1991. Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Intensive Care Med.*
- Ojeda Ojeda, M., Larrondo Muguercia, H., Magdariaga Figuerola, A., Sánchez Valdivia, A., Rodríguez Alonso, I., Valenzuela Silva, C., García Iglesias, E., Domínguez Alonso, E., Buurman, W.A., Araña Rosaínz, M.D.J., 2011. Temporal trends of circulating nitric oxide and pro-inflammatory cytokine responses ex vivo in intra-abdominal sepsis: Results from a cohort study. *Inflamm. Res.* 60, 289–297. doi:10.1007/s00011-010-0267-4
- Opal, S.M., Garber, G.E., LaRosa, S.P., Maki, D.G., Freebairn, R.C., Kinasewitz, G.T., Dhainaut, J.-F., Yan, S.B., Williams, M.D., Graham, D.E., Nelson, D.R., Levy, H., Bernard, G.R., 2003. Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). *Clin. Infect. Dis.* doi:10.1086/375593
- Orlicky, D.J., Roede, J.R., Bales, E., Greenwood, C., Greenberg, A., Petersen, D., Mcmanaman, J.L., 2011. Chronic ethanol consumption in mice alters hepatocyte lipid droplet properties. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35, 1020–1033. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01434.x
- Ostermeyer, A.G., Ramcharan, L.T., Zeng, Y., Lublin, D.M., Brown, D.A., 2004. Role of the hydrophobic domain in targeting caveolin-1 to lipid droplets. *J. Cell Biol.* 164, 69–78. doi:10.1083/jcb.200303037
- Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H., Fujimoto, T., 2005. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J. Cell Sci.* 118, 2601–2611. doi:10.1242/jcs.02401
- Pacheco, P., Bozza, F. a., Gomes, R.N., Bozza, M., Weller, P.F., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., 2002. Lipopolysaccharide-Induced Leukocyte Lipid Body Formation In Vivo: Innate Immunity Elicited Intracellular Loci Involved in Eicosanoid Metabolism. *J. Immunol.* 169, 6498–6506. doi:10.4049/jimmunol.169.11.6498
- Pacheco, P., Vieira-de-Abreu, A., Gomes, R.N., Barbosa-Lima, G., Wermelinger, L.B., Maya-Monteiro, C.M., Silva, A.R., Bozza, M.T., Castro-Faria-Neto, H.C., Bandeira-Melo, C., Bozza, P.T., 2007. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J. Immunol.* 179, 8500–8508. doi:10.4049/jimmunol.179.12.8500
- Pacheco, P., Vieira-de-Abreu, a., Gomes, R.N., Barbosa-Lima, G., Wermelinger, L.B., Maya-Monteiro, C.M., Silva, a. R., Bozza, M.T., Castro-Faria-Neto, H.C., Bandeira-Melo, C., Bozza, P.T., 2007. Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 Controls Microtubule-Driven Biogenesis and Leukotriene B4-Synthesizing Function of Macrophage Lipid Bodies Elicited by Innate Immune Response. *J. Immunol.* 179, 8500–8508.

doi:10.4049/jimmunol.179.12.8500

- Panday, A., Sahoo, M.K., Osorio, D., Batra, S., 2015. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 5–23. doi:10.1038/cmi.2014.89
- Park, D.W., Baek, K., Kim, J.R., Lee, J.J., Ryu, S.H., Chin, B.R., Baek, S.H., 2009. Resveratrol inhibits foam cell formation via NADPH oxidase 1- mediated reactive oxygen species and monocyte chemotactic protein-1. *Exp. Mol. Med.* 41, 171–179. doi:10.3858/emm.2009.41.3.020
- Parkos, C. a, Dinauer, M.C., Jesaitis, a J., Orkin, S.H., Curnutte, J.T., 1989. Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 73, 1416–20.
- Parrillo, J.E., Parker, M.M., Natanson, C., Suffredini, A.F., Danner, R.L., Cunnion, R.E., Ognibene, F.P., 1990. Septic shock in humans: Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy, in: *Annals of Internal Medicine.* pp. 227–242. doi:10.7326/0003-4819-113-3-227
- Paterson, H.M., Murphy, T.J., Purcell, E.J., Shelley, O., Kriynovich, S.J., Lien, E., Mannick, J. a, Lederer, J. a, 2003. Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. *J. Immunol.* 171, 1473–1483. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1473
- Paul, A., Chang, B.H.J., Li, L., Yechoor, V.K., Chan, L., 2008. Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against Atherosclerosis. *Circ. Res.* 102, 1492–1501. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.168070
- Peluso, M.R., Miranda, C.L., Hobbs, D.J., Proteau, R.R., Stevens, J.F., 2010. Xanthohumol and related prenylated flavonoids inhibit inflammatory cytokine production in LPS-activated THP-1 monocytes: Structure-activity relationships and in silico binding to myeloid differentiation protein-2 (MD-2). *Planta Med.* 76, 1536–1543. doi:10.1055/s-0029-1241013
- Persson, T., Popescu, B.O., Cedazo-Minguez, A., 2014. Oxidative stress in alzheimer’s disease: Why did antioxidant therapy fail? *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi:10.1155/2014/427318
- Petronilho, F., Florentino, D., Danielski, L.G., Vieira, L.C., Martins, M.M., Vieira, A., Bonfante, S., Goldim, M.P., Vuolo, F., 2016. Alpha-Lipoic Acid Attenuates Oxidative Damage in Organs After Sepsis. *Inflammation* 39, 357–65. doi:10.1007/s10753-015-0256-4
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.*
- Ploegh, H.L., 2007. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435–438. doi:10.1038/nature06004
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E., Parton, R.G., 2001. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell Biol.* 152, 1057–1070. doi:10.1083/jcb.152.5.1057
- Pollak, N.M., Jaeger, D., Kolleritsch, S., Zimmermann, R., Zechner, R., Lass, A., Haemmerle, G., 2015. The interplay of protein kinase a and Perilipin 5 regulates cardiac lipolysis. *J. Biol. Chem.* 290, 1295–1306. doi:10.1074/jbc.M114.604744
- Prasanna, S.J., Saha, B., Nandi, D., 2007. Involvement of oxidative and nitrosative

- stress in modulation of gene expression and functional responses by IFN $\gamma$ . *Int. Immunol.* 19, 867–79. doi:10.1093/intimm/dxm058
- Pravda, J., 2014. Metabolic theory of septic shock. *World J. Crit. Care Med.* 3, 45–54. doi:10.5492/wjccm.v3.i2.45
- Quoilin, C., Mouithys-Mickalad, a, Lécart, S., Fontaine-Aupart, M.-P., Hoebeke, M., 2014. Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 1790–1800. doi:10.1016/j.bbabi.2014.07.005
- Rada, B., Leto, T., 2008. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox Family NADPH oxidases. *Contrib. Microbiol.* doi:10.1159/000136357
- Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging.* doi:http://dx.doi.org/
- Rambold, A.S., Cohen, S., Lippincott-Schwartz, J., 2015. Fatty acid trafficking in starved cells: Regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. *Dev. Cell* 32, 678–692. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.029
- Ramírez, M., 2013. Multiple organ dysfunction syndrome. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* 43, 273–277. doi:10.1016/j.cppeds.2013.10.003
- Ran, F.A., Hsu, P.D.P.P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. a, Zhang, F., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8, 2281–308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- Ranieri, V.M., Rubenfeld, G.D., Thompson, B.T., Ferguson, N.D., Caldwell, E., Fan, E., Camporota, L., Slutsky, A.S., 2012a. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 307, 2526–33. doi:10.1001/jama.2012.5669
- Ranieri, V.M., Thompson, B.T., Barie, P.S., Dhainaut, J.-F., Douglas, I.S., Finfer, S., Gårdlund, B., Marshall, J.C., Rhodes, A., Artigas, A., Payen, D., Tenhunen, J., Al-Khalidi, H.R., Thompson, V., Janes, J., Macias, W.L., Vangerow, B., Williams, M.D., PROWESS-SHOCK Study Group, 2012b. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N. Engl. J. Med.* 366, 2055–64. doi:10.1056/NEJMoa1202290
- Rathore, R., Zheng, Y.M., Niu, C.F., Liu, Q.H., Korde, A., Ho, Y.S., Wang, Y.X., 2008. Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> through the mitochondrial ROS-PKC $\alpha$  signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1223–1231. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.012
- Ray, P.D., Huang, B.-W., Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24, 981–90. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008
- Read, T.E., Grunfeld, C., Kumwenda, Z.L., Calhoun, M.C., Kane, J.P., Feingold, K.R., Rapp, J.H., 1995. Triglyceride-rich lipoproteins prevent septic death in rats. *J. Exp. Med.* 182, 267–72. doi:10.1084/jem.182.1.267
- Reis, A., Spickett, C.M., 2012. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* doi:10.1016/j.bbamem.2012.02.002
- Remmen, H. Van, Richardson, A., 2001. Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp. Gerontol.* doi:10.1016/S0531-5565(01)00093-6
- Riley, P. a, 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 27–33. doi:10.1080/09553009414550041

- Robenek, H., Buers, I., Hofnagel, O., Robenek, M.J., Troyer, D., Severs, N.J., 2009. Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. doi:10.1016/j.bbalip.2008.12.001
- Robenek, H., Robenek, M.J., Troyer, D., 2005. PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J. Lipid Res.* 46, 1331–1338. doi:10.1194/jlr.M400323-JLR200
- Robenek, M.J., Severs, N.J., Schlattmann, K., Plenz, G., Zimmer, K.P., Troyer, D., Robenek, H., 2004. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *FASEB J.* 18, 866–868. doi:10.1096/fj.03-0782fje
- Ross, M.F., Kelso, G.F., Blaikie, F.H., James, A.M., Cochemé, H.M., Filipovska, A., Da Ros, T., Hurd, T.R., Smith, R.A.J., Murphy, M.P., 2005. Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochem.* 70, 222–230. doi:10.1007/s10541-005-0104-5
- Rosser, D.M., Manji, M., Cooksley, H., Bellingan, G., 1998. Endotoxin reduces maximal oxygen consumption in hepatocytes independent of any hypoxic insult. *Intensive Care Med.* 24, 725–729. doi:10.1007/s001340050651
- Russell, D.W., Sambrook, J., 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour.
- Sair, M., Etherington, P.J., Peter Winlove, C., Evans, T.W., 2001. Tissue oxygenation and perfusion in patients with systemic sepsis. *Crit. Care Med.* 29, 1343–1349.
- Salvemini, D., Cuzzocrea, S., 2002. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1173–1185.
- Santos, S.S., Brunialti, M.K.C., Rigato, O., Machado, F.R., Silva, E., Salomao, R., 2012. Generation of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species by Neutrophils and Monocytes From Septic Patients and Association With Outcomes. *Shock* 38, 18–23. doi:10.1097/SHK.0b013e318257114e
- Schaffer, J.E., 2003. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr. Opin. Lipidol.* 14, 281–287. doi:10.1097/00041433-200306000-00008
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* doi:10.1016/j.cub.2014.03.034
- Sekiya, M., Hiraishi, A., Touyama, M., Sakamoto, K., 2008. Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 602–607. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.068
- Şener, G., Toklu, H., Kapucu, C., Ercan, F., Erkanli, G., Kaçmaz, A., Tilki, M., Yeğen, B.Ç., 2005. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg. Today* 35, 52–59. doi:10.1007/s00595-004-2879-1
- Service, R.F., 2009. Biofuels. ExxonMobil fuels Venter's efforts to run vehicles on algae-based oil. *Science*. doi:10.1126/science.325\_379a
- Seung, B.L., In, H.B., Yun, S.B., Um, H.D., 2006. Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *J. Biol. Chem.* 281, 36228–36235. doi:10.1074/jbc.M606702200
- Shapiro, N., Howell, M.D., Bates, D.W., Angus, D.C., Ngo, L., Talmor, D., 2006. The Association of Sepsis Syndrome and Organ Dysfunction With Mortality in Emergency Department Patients With Suspected Infection. *Ann. Emerg. Med.* 48. doi:10.1016/j.annemergmed.2006.07.007

- Siems, W., Grune, T., 2003. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal, in: *Molecular Aspects of Medicine*. pp. 167–175. doi:10.1016/S0098-2997(03)00011-6
- Sies, H., 1985. Introductory remarks, in: *Oxidative Stress*. pp. 1–8.
- Simons, J.M., 't Hart, B.A., Ip Vai Ching, T.R.A.M., Van Dijk, H., Labadie, R.P., 1990. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 251–258. doi:10.1016/0891-5849(90)90070-Y
- Sims, C.R., MacMillan-Crow, L.A., Mayeux, P.R., 2014. Targeting mitochondrial oxidants may facilitate recovery of renal function during infant sepsis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 96, 662–664. doi:10.1038/clpt.2014.170
- Singer, M., 2013. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* 5, 1–7. doi:10.4161/viru.26907
- Singh, N., Li, L., 2012. Reduced oxidative tissue damage during endotoxemia in IRAK-1 deficient mice. *Mol. Immunol.* 50, 244–252. doi:10.1016/j.molimm.2012.01.011
- Skulachev, V.P., 2012. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J. Alzheimer's Dis.* 28, 283–289. doi:10.3233/JAD-2011-111391
- Slatter, D.A., Bolton, C.H., Bailey, A.J., 2000. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*. doi:10.1007/s001250051342
- Smith, R.A.J., Murphy, M.P., 2010. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ, in: *Annals of the New York Academy of Sciences*. pp. 96–103. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05627.x
- Spagnoli, A., Spadoni, G.L., Sesti, G., Del Principe, D., Germani, D., Boscherini, B., 1995. Effect of insulin on hydrogen peroxide production by human polymorphonuclear leukocytes. Studies with monoclonal anti-insulin receptor antibodies, and an agonist and an inhibitor of protein kinase C. *Horm. Res.* 43, 286–93.
- Stadtman, E.R., Berlett, B.S., 1997. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res. Toxicol.* doi:10.1021/tx960133r
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. doi:10.1007/s00726-003-0011-2
- Stearns-Kurosawa, D.J., Osuchowski, M.F., Valentine, C., Kurosawa, S., Remick, D.G., 2011. The pathogenesis of sepsis. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 19–48. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130327
- Stolk, J., Hiltermann, T.J., Dijkman, J.H., Verhoeven, A.J., 1994. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11, 95–102. doi:10.1165/ajrcmb.11.1.8018341
- Subramanian, V., Garcia, A., Sekowski, A., Brasaemle, D.L., 2004. Hydrophobic sequences target and anchor perilipin A to lipid droplets. *J. Lipid Res.* 45, 1983–1991. doi:10.1194/jlr.M400291-JLR200
- Sumimoto, H., Miyano, K., Takeya, R., 2005. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.210

- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K., Finkel, T., 1995. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270, 296–299. doi:10.1126/science.270.5234.296
- Supinski, G.S., Murphy, M.P., Callahan, L. a, 2009. MitoQ administration prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1095–R1102. doi:10.1152/ajpregu.90902.2008
- Sztalryd, C., Kimmel, A.R., 2014. Perilipins: Lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Biochimie.* doi:10.1016/j.biochi.2013.08.026
- Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J.T., Contreras, J.A., Kimmel, A.R., Londos, C., 2003. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.* 161, 1093–1103. doi:10.1083/jcb.200210169
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S., 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443–451. doi:10.1016/S1074-7613(00)80119-3
- Tansey, J.T., Sztalryd, C., Hlavin, E.M., Kimmel, A.R., Londos, C., 2004. The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life* 56, 379–385. doi:10.1080/15216540400009968
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., Fujimoto, T., 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J. Biol. Chem.* 277, 44507–44512. doi:10.1074/jbc.M207712200
- Tavakoli, S., Asmis, R., 2012. Reactive oxygen species and thiol redox signaling in the macrophage biology of atherosclerosis. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 1785–95. doi:10.1089/ars.2012.4638
- Thomas, G., Roques, B., 1972. Proton magnetic resonance studies of ethidium bromide and its sodium borohydride reduced derivative. *FEBS Lett.* 26, 169–175. doi:10.1016/0014-5793(72)80566-0
- Thomas Plötz, Magnus Hartmann, Sigurd Lenzen, and M.E., 2016. The role of lipid droplet formation in the protection of unsaturated fatty acids against palmitic acid induced lipotoxicity to rat insulin-producing cells. *Nutr. Metab. (Lond).* 13. doi:10.1186/s12986-016-0076-z
- Tormos, K. V., Anso, E., Hamanaka, R.B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Chandel, N.S., 2011. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 14, 537–544. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.007
- Tuma, D.J., Casey, C. a, 2003. Dangerous byproducts of alcohol breakdown--focus on adducts. *Alcohol Res. Health* 27, 285–290.
- Uchida, K., 2003. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids.* doi:10.1007/s00726-003-0015-y
- Umlauf, E., Csaszar, E., Moertelmaier, M., Schuetz, G.J., Parton, R.G., Prohaska, R., 2004. Association of stomatin with lipid bodies. *J. Biol. Chem.* 279, 23699–23709. doi:10.1074/jbc.M310546200
- Uttara, B., Singh, A. V, Zamboni, P., Mahajan, R.T., 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 65–74. doi:10.2174/157015909787602823

- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- van Leeuwen, H.J., Heezius, E.C.J.M., Dallinga, G.M., van Strijp, J.A.G., Verhoef, J., van Kessel, K.P.M., 2003. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 31, 1359–66. doi:10.1097/01.CCM.0000059724.08290.51
- VanderMeer, T.J., Wang, H., Fink, M.P., 1995. Endotoxemia causes ileal mucosal acidosis in the absence of mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock. *Crit. Care Med.* 23, 1217–26. doi:10.1097/00003246-199507000-00011
- Vejrazka, M., Mícek, R., Stípek, S., 2005. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1722, 143–147. doi:10.1016/j.bbagen.2004.12.008
- Viačková, D., Pekarová, M., Crhák, T., Búcsaiová, M., Matiašovic, J., Lojek, A., Kubala, L., 2011. Redox-sensitive regulation of macrophage-inducible nitric oxide synthase expression in vitro does not correlate with the failure of apocynin to prevent lung inflammation induced by endotoxin. *Immunobiology* 216, 457–465. doi:10.1016/j.imbio.2010.09.005
- Victor, V.M., De La Fuente, M., 2003. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-kappa B. *Free Radic. Res.* 37, 19–27. doi:10.1080/1071576021000038522
- Víctor, V.M., Espulgues, J. V, Hernández-Mijares, A., Rocha, M., 2009. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infect. Disord. Drug Targets* 9, 376–89. doi:10.2174/187152609788922519
- Víctor, V.M., Miñano, M., Guayerbas, N., del Río, M., Medina, S., De la Fuente, M., 1998. Effects of endotoxic shock in several functions of murine peritoneal macrophages. *Mol. Cell. Biochem.* 189, 25–31.
- Vieira-De-Abreu, A., Assis, E.F., Gomes, G.S., Castro-Faria-Neto, H.C., Weller, P.F., Bandeira-Melo, C., Bozza, P.T., 2005. Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C4 synthesis within eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 254–261. doi:10.1165/rcmb.2005-0145OC
- Vieira-de-Abreu, A., Calheiros, A.S., Mesquita-Santos, F.P., Magalhães, E.S., Mourão-Sá, D., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, M.T., Bandeira-Melo, C., Bozza, P.T., 2010. Crosstalk between MIF and Eotaxin in Allergic Eosinophil Activation Forms LTC4-Synthesizing Lipid Bodies. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* doi:10.1165/rcmb.2010-0004OC
- Vilaro, S., Llobera, M., 1988. Uptake and Metabolism of Intralipid by Rat Liver: An Electron-Microscopic Study. *J. Nutr.* 118, 932–940.
- Vincent, J.L., Marshall, J.C., Namendys-Silva, S. a., François, B., Martin-Loeches, I., Lipman, J., Reinhart, K., Antonelli, M., Pickkers, P., Njimi, H., Jimenez, E., Sakr, Y., 2014. Assessment of the worldwide burden of critical illness: The Intensive Care Over Nations (ICON) audit. *Lancet Respir. Med.* 2, 380–386. doi:10.1016/S2213-2600(14)70061-X
- Vincent, J.L., Opal, S.M., Marshall, J.C., Tracey, K.J., 2013. Sepsis definitions: Time for change. *Lancet* 381, 774–775. doi:10.1016/S0140-6736(12)61815-7

- Wältermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U., Galla, H.J., Kalscheuer, R., Stöveken, T., Von Landenberg, P., Steinbüchel, A., 2005. Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: How bacteria fatten up. *Mol. Microbiol.* 55, 750–763. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04441.x
- Wan, H.-C., Melo, R.C.N., Jin, Z., Dvorak, A.M., Weller, P.F., 2007. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J.* 21, 167–178. doi:10.1096/fj.06-6711com
- Wang, C., Zhao, Y., Gao, X., Li, L., Yuan, Y., Liu, F., Zhang, L., Wu, J., Hu, P., Zhang, X., Gu, Y., Xu, Y., Li, Z., Zhang, H., Ye, J., 2014. Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis. *Hepatology* 1–34. doi:10.1002/hep.27409
- Wang, H., Sreenivasan, U., Sreenevasan, U., Hu, H., Saladino, A., Polster, B.M., Lund, L.M., Gong, D., Stanley, W.C., Sztalryd, C., 2011. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J. Lipid Res.* 52, 2159–68. doi:10.1194/jlr.M017939
- Wang, X., Evans, R.D., 1997. Effect of endotoxin and platelet-activating factor on lipid oxidation in the rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 1915–26. doi:10.1006/jmcc.1997.0430
- Wendel, M., Paul, R., Heller, A.R., 2007. Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. *Intensive Care Med.* doi:10.1007/s00134-006-0433-x
- West, a P., Shadel, G.S., Ghosh, S., 2011. Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 389–402. doi:10.1038/nri2975
- Wilhelms, S.B., Huss, F.R., Granath, G., Sjöberg, F., 2010. Assessment of incidence of severe sepsis in Sweden using different ways of abstracting International Classification of Diseases codes: difficulties with methods and interpretation of results. *Crit. Care Med.* 38, 1442–9. doi:10.1097/CCM.0b013e3181de4406
- Winterbourn, C.C., Buss, I.H., Chan, T.P., Plank, L.D., Clark, M.A., Windsor, J.A., 2000. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 28, 143–9.
- Wittebole, X., Castanares-Zapatero, D., Laterre, P.F., 2010. Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis. *Mediators Inflamm.* doi:10.1155/2010/568396
- Wolins, N.E., Quaynor, B.K., Skinner, J.R., Tzekov, A., Croce, M.A., Gropler, M.C., Varma, V., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Kern, P.A., Finck, B.N., Bickel, P.E., 2006. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes* 55, 3418–3428. doi:10.2337/db06-0399
- Wolins, N.E., Rubin, B., Brasaemle, D.L., 2001. TIP47 Associates with Lipid Droplets. *J. Biol. Chem.* 276, 5101–5108. doi:10.1074/jbc.M006775200
- Wood, L.G., Gibson, P.G., Garg, M.L., 2003. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur. Respir. J.* 21, 177–86. doi:10.1183/09031936.03.00017003
- Wooten, R.E., Willingham, M.C., Daniel, L.W., Leslie, C.C., Rogers, L.C., Sergeant, S., O’Flaherty, J.T., 2008. Novel translocation responses of cytosolic phospholipase A2?? fluorescent proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783, 1544–1550. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.03.008
- Wosniak, J., Santos, C.X.C., Kowaltowski, A.J., Laurindo, F.R.M., 2009. Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: effects of mild mitochondrial

- dysfunction on angiotensin II-mediated increase in Nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1265–1278. doi:10.1089/ars.2009.2392
- Wu, C.C., Howell, K.E., Neville, M.C., Yates, J.R., McManaman, J.L., 2000. Proteomics reveal a link between the endoplasmic reticulum and lipid secretory mechanisms in mammary epithelial cells, in: *Electrophoresis*. pp. 3470–3482. doi:10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3470::AID-ELPS3470>3.0.CO;2-G
- Ximenes, V.F., Kanegae, M.P.P., Rissato, S.R., Galhiane, M.S., 2007. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 457, 134–141. doi:10.1016/j.abb.2006.11.010
- Xu, G., Sztalryd, C., Lu, X., Tansey, J.T., Gan, J., Dorward, H., Kimmel, A.R., Londos, C., 2005. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 42841–42847. doi:10.1074/jbc.M506569200
- Xu, W., Lu, Y., Yao, J., Li, Z., Chen, Z., Wang, G., Jing, H., Zhang, X., Li, M., Peng, J., Tian, X., 2014. Novel role of resveratrol: suppression of high-mobility group protein box 1 nucleocytoplasmic translocation by the upregulation of sirtuin 1 in sepsis-induced liver injury. *Shock* 42, 440–7. doi:10.1097/SHK.0000000000000225
- Yin, H., Xu, L., Porter, N.A., 2011. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* doi:10.1021/cr200084z
- Yu, W., Bozza, P.T., Tzizik, D.M., Gray, J.P., Cassara, J., Dvorak, A.M., Weller, P.F., 1998. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am. J. Pathol.* 152, 759–769.
- Yu, W., Cassara, J., Weller, P.F., 2000. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood* 95, 1078–1085.
- Yvan-Charvet, L., Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Terasaka, N., Li, R., Welch, C., Tall, A.R., 2007. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3900–3908. doi:10.1172/JCI33372
- Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., Hauser, C.J., 2010. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464, 104–7. doi:10.1038/nature08780
- Zhang, S.O., Box, A.C., Xu, N., Le Men, J., Yu, J., Guo, F., Trimble, R., Mak, H.Y., 2010. Genetic and dietary regulation of lipid droplet expansion in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4640–4645. doi:10.1073/pnas.0912308107
- Zhao, H., Joseph, J., Fales, H.M., Sokoloski, E.A., Levine, R.L., Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., 2005. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5727–32. doi:10.1073/pnas.0501719102
- Zhao, H., Kalivendi, S., Zhang, H., Joseph, J., Nithipatikom, K., Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., 2003. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: Potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* 34,

1359–1368. doi:10.1016/S0891-5849(03)00142-4

- Zhong, W., Qian, K., Xiong, J., Ma, K., Wang, A., Zou, Y., 2016. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B related signaling. *Biomed. Pharmacother.* 83, 302–313. doi:10.1016/j.biopha.2016.06.036
- Zhong, Y., Liu, T., Lai, W., Tan, Y., Tian, D., Guo, Z., 2013. Heme oxygenase-1-mediated reactive oxygen species reduction is involved in the inhibitory effect of curcumin on lipopolysaccharide-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in RAW264.7 macrophages. *Mol. Med. Rep.* 7, 242–246. doi:10.3892/mmr.2012.1138
- Zielonka, J., Kalyanaraman, B., 2010. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. *Free Radic. Biol. Med.* doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.028