

Giselli Scaini^{1,3}, Natália Rochi^{1,3},
Joana Benedet^{1,3}, Gabriela
Kozuchowski Ferreira^{1,3}, Brena
Pereira Teodorak^{1,3}, Clarissa
Martinelli Comim^{2,3}, Larissa
de Souza Constantino^{1,3},
Francieli Vuolo^{1,3}, Leandra Celso
Constantino^{2,3}, João Quevedo^{2,3},
Emílio Luiz Streck^{1,3}, Felipe Dal-
Pizzol^{1,3}

1. Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense – Criciúma (SC), Brasil.
2. Laboratório de Neurociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense – Criciúma (SC), Brasil.
3. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina – Porto Alegre (RS), Brasil.

Estudo realizado no Laboratório de Fisiopatologia Experimental – Universidade do Extremo Sul Catarinense – Criciúma (SC), Brasil.

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 4 de março de 2011

Aceito em 28 de março de 2011

Autor para correspondência:

Felipe Dal-Pizzol
Laboratório de Fisiopatologia Experimental
Universidade do Extremo Sul Catarinense
CEP: 88806-000 – Criciúma (SC), Brasil.
Fax: (48) 3431-2539
E-mail: piz@unesoc.net

Inibição da atividade da citrato sintase cerebral em um modelo animal de sepse

Inhibition of brain citrate synthase activity in an animal model of sepsis

RESUMO

Objetivo: Um amplo corpo de evidência oriundo de estudos experimentais indica que a sepse se associa com um aumento da produção de espécies de oxigênio reativo, depleção de antioxidantes, e acúmulo de marcadores de estresse oxidativo. Além disto, a disfunção mitocondrial foi implicada na patogênese da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos. A citrato sintase é uma enzima que se localiza no interior das células, na matriz mitocondrial, sendo uma etapa importante do ciclo de Krebs; esta enzima foi utilizada como um marcador enzimático quantitativo da presença de mitocôndrias intactas. Assim, investigamos a atividade da citrato sintase no cérebro de ratos submetidos ao modelo sepse com de ligadura e punção do ceco.

Métodos: Em diferentes horários (3, 6, 12, 24 e 48 horas) após cirurgia de ligadura e punção do ceco, seis ratos foram sacrificados por decapitação, sendo seus cérebros removidos e dissecados o hipocampo, estriato, cerebelo, córtex cerebral e córtex pré-frontal, e utilizados para deter-

minação da atividade de citrato sintase.

Resultados: Verificamos que a atividade de citrato sintase no córtex pré-frontal estava inibida após 12, 24 e 48 horas da ligadura e punção do ceco. No córtex cerebral, esta atividade estava inibida após 3, 12, 24 e 48 horas da ligadura e punção do ceco. Por outro lado a citrato sintase não foi afetada no hipocampo, estriato e cerebelo até 48 horas após a ligadura e punção do ceco.

Conclusão: Considerando-se que é bem descrito o comprometimento da energia decorrente da disfunção mitocondrial na sepse, e que o estresse oxidativo desempenha um papel essencial no desenvolvimento da sepse, acreditamos que o comprometimento da energia pode também estar envolvido nestes processos. Se a inibição da citrato sintase também ocorre em um modelo de sepse, é tentador especular que a redução do metabolismo cerebral pode provavelmente estar relacionada com a fisiopatologia desta doença.

Descritores: Citrato (si)-sintase/ metabolismo; Sepse; Mitocôndrias; Ratos Wistar; Modelos animais

INTRODUÇÃO

A sepse e as síndromes a ela relacionadas, como a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), são as causas mais frequentes de morbidade e mortalidade em unidades de terapia intensiva, contribuindo apenas nos Estados Unidos para 750.000 casos por ano, com uma mortalidade média de 29%.⁽¹⁾ A sepse é definida como uma reação do hospedeiro à infecção caracterizada por inflamação sistêmica,⁽²⁾ sendo uma síndrome complexa caracterizada por um desequilíbrio entre as respostas pró e antiinflamatória ao patógeno.⁽³⁾

Evidências da literatura demonstram que espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um importante papel no desenvolvimento da insuficiência de múltiplos órgãos.

tiplos órgãos e do choque séptico.⁽⁴⁻⁸⁾ O tratamento para reduzir a geração ou prevenir ou reverter os efeitos das EROs exerce um efeito benéfico em uma série de modelos de choque endotóxico e séptico.⁽⁹⁻¹⁵⁾

Foi bem descrito que a disfunção mitocondrial está implicada na patogênese da síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) e em uma ampla variedade de condições de doença.^(3,16-18) A hipótese da hipóxia citopática postula que o comprometimento da fosforilação oxidativa mitocondrial reduz a produção aeróbica de andenosina trifosfato (ATP) e potencialmente induz a SDMO.⁽¹⁹⁾ Neste contexto, alguns trabalhos relatam a presença na sepse de deficiências na cadeia de transporte de elétrons.⁽¹⁹⁻²²⁾

A citrato sintase (EC 4.1.3.7) se localiza no interior das células, na matriz mitocondrial, e cataliza a condensação do oxaloacetato e do grupo acetil da acetil coenzima-A (acetil CoA), a primeira fase do ciclo de Krebs. Nesta fase, o oxaloacetato reage com acetil CoA e H₂O, produzindo citrato e CoA. Quando o suprimento de energia celular é alto, esta enzima é inibida por quantidades elevadas de ATP, acetil CoA e NADH. Esta regulação assegura que o ciclo de Krebs não oxide um excesso de piruvato e acetil CoA quando as concentrações intracelulares de ATP são elevadas.⁽²³⁾ Além disto, a citrato sintase foi utilizada como marcador enzimático quantitativo da presença de mitocôndrias intactas.⁽²⁴⁾

Assim, considerando que a citrato sintase desempenha um papel importante no metabolismo energético cerebral e que a disfunção mitocondrial tem sido implicada na patogênese da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, neste estudo investigamos se a sepse induzida por ligadura e punção do ceco (LPC) modifica a atividade da citrato sintase no cérebro.

MÉTODOS

Animais

Foram obtidos ratos Wistar adultos (60 dias de idade) junto ao biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram acomodados em grupos de cinco animais por gaiola, com alimentos e água fornecidos ad libitum e com ciclos de luz/sombra de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas da manhã). Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados em conformidade com as diretrizes do Instituto Nacional de Saúde para cuidados e uso de animais de laboratório e as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC).

Cirurgia de ligadura e perfuração do ceco

Os animais foram submetidos a LPC conforme descrição prévia de Ritter et al.⁽²⁵⁾ Em resumo, os ratos foram anestesia-

dos com uma mescla de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada por via intraperitoneal. Sob condições assépticas, foi realizada uma laparotomia mediana de 3 cm para permitir a exposição do ceco e áreas adjacentes. O ceco foi submetido a ligadura com fio de seda 3.0 em sua base, abaixo da válvula ileocecal, e perfurado uma vez com uma agulha calibre 14. O ceco foi então delicadamente espremido para provocar a saída de uma pequena quantidade de fezes pelo local perfurado, e devolvido à cavidade peritoneal; a laparotomia foi fechada por meio de sutura com fio de seda 4.0. Todos os animais receberam solução salina isotônica (50 ml/kg, s.c.) imediatamente após o procedimento. Todos os animais foram devolvidos às suas gaiolas com acesso livre a alimentos e água. No grupo com cirurgia falsa, os ratos foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos e receberam solução salina isotônica (50 m/kg s.c.) imediatamente após o procedimento.

Os grupos cirurgia falsa ou LPC foram randomizados durante o procedimento. Em momentos diferentes (3, 6, 12, 24 e 48 horas) após a cirurgia de LPC ou falsa, seis ratos foram sacrificados por decapitação, e as estruturas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo, estriato, cerebelo e córtex cerebral) foram imediatamente isolados e armazenados a -80°C. Todos os animais apresentaram sinais de encefalopatia após 6 horas de sepse (letargia, leve ataxia, ausência de movimentação espontânea, perda do reflexo de endireitamento), e gradualmente retornaram à sua condição normal de vigília 24-36 horas após a LPC.⁽²⁶⁾

Para minimizar a possibilidade de que os animais não desenvolvessem sepse após o procedimento de LPC, o procedimento foi sempre realizado pelos mesmos investigadores. Além disto, todos os animais foram observados após a LPC para determinar sinais de infecção (piloereção, letargia, taquipnéia e perda de peso), e o número de animais que sobreviveram correspondeu a nossos relatos prévios.⁽²⁵⁾

Preparação do tecido e homogenado

Doze horas após a última injeção, os ratos foram sacrificados por decapitação, o cérebro foi removido, e os tecidos do córtex pré-frontal, hipocampo, estriato, cerebelo e córtex cerebral foram homogenizados (1:10, w/v) em tampão SETH, pH 7,4 (25 nM sacarose, 2 mM EDTA, 10 mM de base Trizma, 50 UI/ml de heparina). Os homogenados foram centrifugados a 800 × g por 10 minutos e o sobrenadante mantido a -70°C até sua utilização para determinar a atividade enzimática. O período máximo entre a preparação do homogenado e a análise enzimática foi sempre inferior a 5 dias. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método descrito por Lowry et al.⁽²⁷⁾, utilizando como padrão albumina sérica bovina.

Atividade de citrato sintase

O método de ensaio da atividade de citrato sintase foi o descrito por Srere et al.⁽²⁸⁾ A mistura para a reação continha 100 mM Tris, pH 8,0, 0,1 mM acetil-CoA, 0,1 mM 5,5'-di-tiobis-(2 ácido nitrobenzóico), 0,1% triton X-100, e 2-4 µg de proteína sobrenadante, e foi iniciado com oxaloacetato 0,2 mM e monitorado com 412 nm por 3 minutos a 25°C.

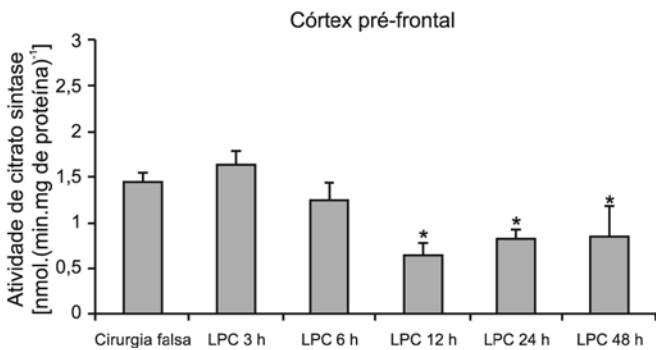
Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey quando o F era significativa. Todas as análises foram realizadas por meio do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). As diferenças foram consideradas significantes quando obtidos valores de p<0,05.

RESULTADOS

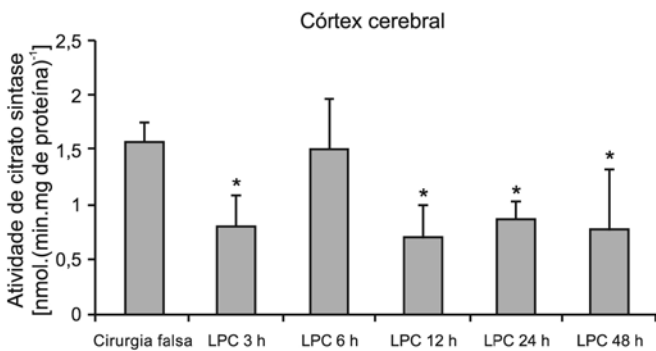
Nossos resultados demonstraram que a atividade da citrato sintase no córtex pré-frontal não foi afetada após 3 e 6 horas da LPC. Entretanto, a enzima foi significativamente inibida após

12, 24 e 48 horas da LPC (Figura 1). Conforme a Figura 2 demonstra, a atividade de citrato sintase no córtex cerebral foi significativamente inibida após 3, 12, 24 e 48 horas da LPC. Além do mais, a enzima não foi afetada na avaliação após 6 horas da LPC. Finalmente, a citrato sintase não foi afetada no hipocampo, estriado e cerebelo até 48 horas após a LPC (Figuras 3, 4 e 5, respectivamente).



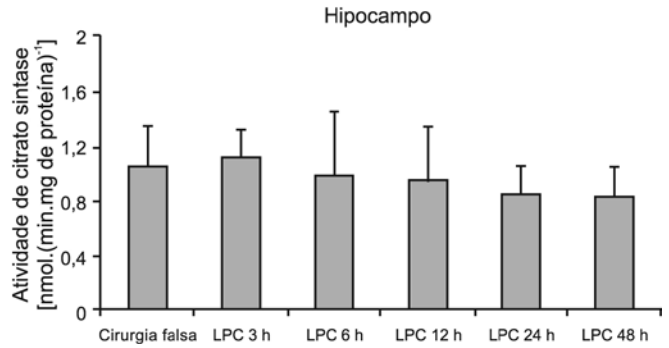
Resultados expressos como média ± DP (n=6). Diferente do grupo controle. *p<0,05 (ANOVA de uma via, seguido por Tukey).

Figura 1 – Atividade de citrato sintase no córtex pré-frontal de ratos após 3, 6, 12, 24 e 48 horas ligadura e punção do ceco (LPC).



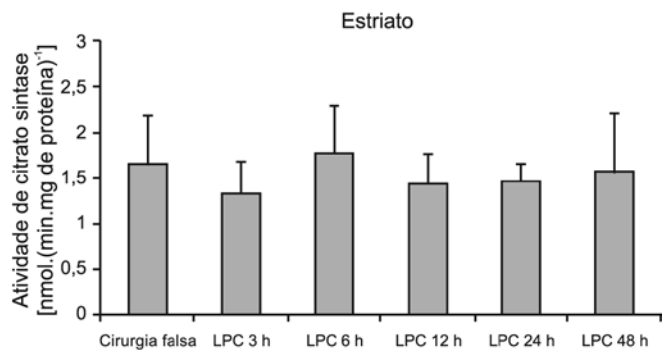
Resultados expressos como média ± DP (n=6). Diferente do grupo controle. *p<0,05 (ANOVA de uma via, seguido por Tukey).

Figura 2 – Atividade de citrato sintase no córtex cerebral de ratos após 3, 6, 12, 24 e 48 horas ligadura e punção do ceco (LPC).



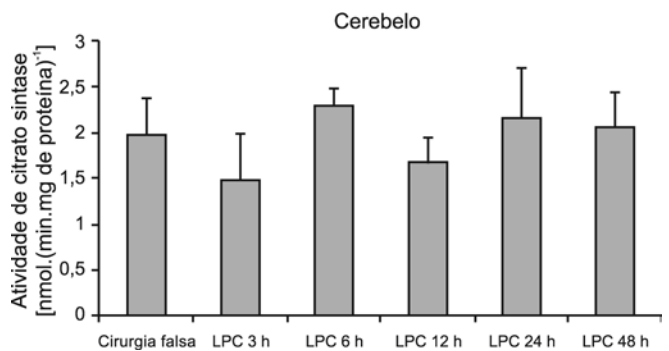
Resultados expressos como média ± DP (n=6). Diferente do grupo controle. *p<0,05 (ANOVA de uma via, seguido por Tukey).

Figura 3 – Atividade de citrato sintase no hipocampo de ratos após 3, 6, 12, 24 e 48 horas ligadura e punção do ceco (LPC).



Resultados expressos como média ± DP (n=6). Diferente do grupo controle. *p<0,05 (ANOVA de uma via, seguido por Tukey).

Figura 4 – Atividade de citrato sintase no estriado de ratos após 3, 6, 12, 24 e 48 horas ligadura e punção do ceco (LPC).



Resultados expressos como média ± DP (n=6). Diferente do grupo controle. *p<0,05 (ANOVA de uma via, seguido por Tukey).

Figura 5 – Atividade de citrato sintase no cerebelo de ratos após 3, 6, 12, 24 e 48 horas ligadura e punção do ceco (LPC).

DISCUSSÃO

Foi descrita a ocorrência de morte celular no sistema nervoso central (SNC) durante a sepse em modelos de roedores e em seres humanos.^(29,30) Um extenso corpo de evidência oriundo de estudos experimentais e clínicos indica que a sepse se associa com aumento da produção de EROs, depleção de antioxidantes, e acúmulo de marcadores de estresse oxidativo.

A evidência direta da produção de radicais livre na sepse vem de estudos utilizando 'spin traps' para detectar produção de radicais hidroxil e NO por meio de espectroscopia de ressonância paramagnética em ratos, e detecção da produção de radicais ascorbato em pacientes sépticos.^(31,32) O aumento da atividade da xantina oxidase (XO), um dos importantes fatores contribuintes para a produção de EROs, foi relatado em pacientes com sepse.⁽³³⁾ Além disto, para demonstrar produção de EROs, alguns estudos demonstraram diminuição das defesas antioxidantes que levam a desequilíbrio redox na sepse. Foi demonstrado que a reposição de glutathione por meio de N-acetilcisteína e glutathione diminui o estresse oxidativo em pacientes com sepse.⁽³⁴⁾ Demonstrou-se também que o aumento da produção de EROs e a diminuição dos antioxidantes são acompanhados de peroxidação lipídica em pacientes com sepse, comparativamente aos pacientes controle.⁽³⁵⁾

Mais ainda, a cadeia respiratória é também um importante pilar da fisiopatologia da sepse, já que a mitocôndria desempenha um papel crítico na produção de energia celular por meio da síntese de ATP dependente da cadeia de transporte de elétrons e é o principal local de produção de EROs. Como resultado do insulto inflamatório, as mitocôndrias sofrem danos funcionais e estruturais. Realizamos previamente uma curva de tempo após a LPC avaliando as atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial I, II, III e IV e creatinoquinase; demonstramos que o metabolismo energético cerebral é alterado seis e doze horas após a LPC.⁽³⁶⁾ Mais especificamente, foi observado que animais submetidos a LPC apresentaram diminuição da atividade da cadeia respiratória mitocondrial nos complexos I e II, porém não nos complexos III e IV, após 24, 48 e 96 horas. A atividade da succinato desidrogenase (uma importante enzima do ciclo de Krebs) estava diminuída após 48 e 96 horas em todas as estruturas analisadas.⁽³⁷⁾ Além disto, alguns trabalhos indicam que a geração mitocondrial de radicais livres está aumentada na sepse.^(38,39)

Assim, a produção de EROs perpetua e propaga a lesão mitocondrial, levando a edema mitocondrial e diminuição do conteúdo de citocromo c na mitocôndria.⁽⁴⁰⁾ Desta forma, os desarranjos na função mitocondrial afetam principalmente as células que têm alta demanda energética, como os neurônios,⁽⁴¹⁾ e o comprometimento da energia cerebral foi ligado

à morte neuronal e neuro-degeneração.⁽⁴²⁾ Neste contexto, durante a sepse o cérebro pode ser um dos primeiros órgãos afetados, e a encefalopatia associada é freqüente, porém pouco reconhecida.^(43,44) Em modelos de sepse polimicrobiana em animais ocorre encefalopatia, e os sobreviventes apresentam comprometimento cognitivo que pode ser secundário a dano do SNC.⁽²⁶⁾ Adicionalmente, sobreviventes de unidades de terapia intensiva, inclusive pacientes sépticos, podem ter morbidade persistente relacionada ao cérebro, inclusive déficits neuro-cognitivos e desenvolvimento de transtornos psiquiátricos.⁽⁴⁵⁻⁴⁹⁾

No presente estudo demonstramos que a atividade da citrato sintase está inibida no córtex pré-frontal e córtex cerebral de ratos adultos após sepse induzida por LPC. Desta forma, considerando que o comprometimento energético conseqüente à disfunção mitocondrial na sepse é bem descrito e que a citrato sintase tem sido utilizada como marcador enzimático quantitativo da presença de mitocôndrias intactas, cremos que o comprometimento energético pode também estar envolvido nestes processos. Se a inibição da citrato sintase também ocorre em um modelo de sepse, é tentador especular que a redução do metabolismo cerebral pode provavelmente estar relacionada com a fisiopatologia desta doença.

Está bem descrito que as lesões do córtex pré-frontal se associam com desinibição social, descontrole dos impulsos, disfunções organizacionais, de planejamento e atenção, quebra da fluência e retardamento de comportamentos espontâneos.⁽⁵⁰⁾ Konarska et al.⁽⁵¹⁾ relataram que déficits regionais do lobo frontal, particularmente do cíngulo anterior e córtex frontal, parecem diferenciar de forma consistente os pacientes com transtornos do sistema nervoso central dos pacientes da população geral. Formulamos, portanto, a hipótese de que a disfunção mitocondrial na sepse pode estar relacionada com dano do SNC.

CONCLUSÃO

Em conclusão, demonstramos que a citrato sintase é diminuída pela LPC no córtex pré-frontal e no córtex cerebral. Estes dados corroboram os de outros estudos, sugerindo que a disfunção mitocondrial está implicada na patogênese da LPC.

AGRADECIMENTOS

Este estudo recebeu apoio financeiro do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ABSTRACT

Objective: An extensive body of evidence from experimental studies indicates that sepsis is associated with increased reactive oxygen species production, depletion of antioxidants, and accumulation of markers of oxidative stress. Moreover, mitochondrial dysfunction has been implicated in the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Citrate synthase is an enzyme localized in the mitochondrial matrix and an important component of the Krebs cycle; consequently, citrate synthase has been used as a quantitative enzyme marker for the presence of intact mitochondria. Thus, we investigated citrate synthase activity in the brains of rats submitted to a cecal ligation puncture model of sepsis.

Methods: At several times points (3, 6, 12, 24 and 48 hours) after the cecal ligation puncture operation, six rats were killed by decapitation. Their brains were removed, and the hippocampus, striatum, cerebellum, cerebral cortex and prefrontal cortex were

dissected and used to determine citrate synthase activity.

Results: We found that citrate synthase activity in the prefrontal cortex was inhibited 12, 24 and 48 hours after cecal ligation puncture. In the cerebral cortex, citrate synthase activity was inhibited 3, 12, 24 and 48 hours after cecal ligation puncture. Citrate synthase was not affected in the hippocampus, striatum or cerebellum up to 48 hours after cecal ligation puncture.

Conclusion: Considering that energy impairment due to mitochondrial dysfunction in sepsis has been well described and that oxidative stress plays a crucial role in sepsis development, we believe that energy impairment may also be involved in these processes. If citrate synthase inhibition also occurs in a sepsis model, it is tempting to speculate that a reduction in brain metabolism may be related to the pathophysiology of this disease.

Keywords: Citrate (si)-synthase/metabolism; Sepsis; Mitochondria; Brain; Rats, Wistar; Models, animal

REFERÊNCIAS

- Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR, Black E, Schwartz JS, Moore R, Johnson BL Jr, Platt R; Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA*. 1997;278(3):234-40.
- Vandijck D, Decruyenaere JM, Blot SI. The value of sepsis definitions in daily ICU-practice. *Acta Clin Belg*. 2006;61(5):220-6.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138-50. Review.
- Basu S, Eriksson M. Oxidative injury and survival during endotoxemia. *FEBS Lett*. 1998;438(3):159-60.
- Zhang H, Slutsky AS, Vincent JL. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction. *Intensive Care Med*. 2000;26(4):474-6.
- Kozlov AV, Szalay L, Umar F, Fink B, Kropik K, Nohl H, et al. EPR analysis reveals three tissues responding to endotoxin by increased formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(12):1555-62.
- Ritter C, Andrades M, Frota Júnior ML, Bonatto F, Pinho RA, Polydoro M, et al. Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med*. 2003;29(10):1782-9.
- Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, et al. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med*. 2006;34(3):886-9.
- Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF Jr, Dikdan GS. Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surg*. 1991;57(2):86-8.
- Villa P, Ghezzi P. Effect of N-acetyl-L-cysteine on sepsis in mice. *Eur J Pharmacol*. 1995;292(3-4):341-4.
- Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AM, Aarsman CJ, van Oirschot JF, van der Bruggen T, van Asbeck BS. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(4 Pt 1):1283-93.
- Kong CW, Tsai K, Chin JH, Chan WL, Hong CY. Magnolol attenuates peroxidative damage and improves survival of rats with sepsis. *Shock*. 2000;13(1):24-8.
- Vulcano M, Meiss RP, Isturiz MA. Deferoxamine reduces tissue injury and lethality in LPS-treated mice. *Int J Immunopharmacol*. 2000;22(8):635-44.
- Salvemini D, Cuzzocrea S. Therapeutic potential of superoxide dismutase mimetics as therapeutic agents in critical care medicine. *Crit Care Med*. 2003;31(1 Suppl):S29-38. Review.
- Thiemermann C. Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit Care Med*. 2003;31(1 Suppl):S76-84.
- Brealey D, Singer M. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Curr Infect Dis Rep*. 2003;5(5):365-71.
- Streck EL, Delwing D, Tagliari B, Matté C, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria. *Neurochem Int*. 2003;43(6):597-602.
- Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 2005;39:359-407.
- Fink MP. Bench-to-bedside review: cytopathic hypoxia. *Crit Care*. 2002;6(6):491-9.
- Singer M, Brealey D. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Biochem Soc Symp*. 1999;66:149-66.
- Forget AP, Mangalaboyi J, Mordon S, Guery B, Vallet B,

- Fourrier F, Chopin C. Escherichia coli endotoxin reduces cytochrome aa₃ redox status in pig skeletal muscle. *Crit Care Med.* 2000;28(10):3491-7.
22. Chen HW, Hsu C, Lu TS, Wang SJ, Yang RC. Heat shock pretreatment prevents cardiac mitochondrial dysfunction during sepsis. *Shock.* 2003;20(3):274-9.
23. Shepherd D, Garland PB. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J.* 1969;114(3):597-610.
24. Marco R, Pestaña A, Sebastian J, Sols A. Oxaloacetate metabolic crossroads in liver. Enzyme compartmentation and regulation of gluconeogenesis. *Mol Cell Biochem.* 1974;3(1):53-70.
25. Ritter C, Andrades ME, Reinke A, Menna-Barreto S, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. *Crit Care Med.* 2004;32(2):342-9.
26. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2005;33(1):221-3; discussion 262-3.
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
28. Srere PA. Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 1969;13:3-11.
29. Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat.* 2005;30(2-3):144-57.
30. Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, Brouland JP, Hopkinson NS, Françoise G. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol.* 2004;14(1):21-33.
31. Sato K, Kadiiska MB, Ghio AJ, Corbett J, Fann YC, Holland SM, et al. In vivo lipid-derived free radical formation by NADPH oxidase in acute lung injury induced by lipopolysaccharide: a model for ARDS. *FASEB J.* 2002;16(13):1713-20.
32. Linares E, Nakao LS, Augusto O, Kadiiska MB. ERP studies of in vivo radical production by lipopolysaccharide: potential role of iron mobilized from iron-nitrosyl complexes. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(6):766-73.
33. Batra S, Kumar R, Seema, Kapoor AK, Ray G. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. *Ann Trop Paediatr.* 2000;20(1):27-33.
34. Ortolani O, Conti A, De Gaudio AR, Moraldi E, Cantini Q, Novelli G. The effect of glutathione and N-acetylcysteine on lipoperoxidative damage in patients with early septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(6):1907-11.
35. Bayir H. Reactive oxygen species. *Crit Care Med.* 2005;33(12 Suppl):498-501.
36. Comim CM, Rezin GT, Scaini G, Di-Pietro PB, Cardoso MR, Petronilho FC, et al. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion.* 2008;8(4):313-8.
37. Comim CM, Constantino LC, Barichello T, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in the septic brain. *Curr Neurovasc Res.* 2009;6(3):194-203.
38. Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris A, et al. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J.* 1999;13(12):1637-46.
39. Callahan LA, Stofan D, Szweda L, Nethery DE, Supinski GS. Free radicals alter maximal diaphragmatic oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(1):129-38.
40. Crouser ED. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion.* 2004;4(5-6):724-41.
41. Enns GM. The contribution of mitochondria to common disorders. *Mol Genet Metab.* 2003;80(1-2):11-26. Review.
42. Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(2):C670-86. Review.
43. Milbrandt EB, Angus DC. Bench-to bedside review: critical illness-associated cognitive dysfunction-mechanisms, markers, and emerging therapeutics. *Crit Care.* 2006;10(6):238.
44. Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D. Sepsis associated delirium. *Intensive Care Med.* 2007; 33(6):941-50.
45. Hopkins RO, Weaver LK, Pope D, Orme JF, Bigler ED, Larson-LOHR V. Neuropsychological sequelae and impaired health status in survivors of severe acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(1):50-6.
46. Angus DC, Musthafa AA, Clermont G, Griffin MF, Linde-Zwirble WT, Dremsizov TT, Pinsky MR. Quality-adjusted survival in the first year after the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(6):1389-94.
47. Granja C, Dias C, Costa-Pereira A, Sarmiento A. Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness. *Crit Care.* 2004;8(2):R91-8.
48. Granja C, Lopes A, Moreira S, Dias C, Costa-Pereira A, Carneiro A; JMIP Study Group. Patients' recollections of experiences in the intensive care unit may affect their quality of life. *Crit Care.* 2005;9(2):R96-109.
49. Hopkins RO, Weaver LK, Collingridge D, Parkinson RB, Chan KJ, Orme JF Jr. Two-year cognitive, emotional, and quality-of-life outcomes in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(4):340-7.
50. Lou H. Etiology and pathogenesis of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): significance of prematurity and perinatal hypoxic-haemodynamic encephalopathy. *Acta Paediatr.* 1996;85(11):1266-71.
51. Konarska M, Stewart RE, McCarty R. Predictability of chronic intermittent stress: effects on sympathetic-adrenal medullary responses of laboratory rats. *Behav Neural Biol.* 1990;53(2):231-43.