Joleen Lopes Machado

Estudo sobre a produção e a ação dos peptídeos antimicrobianos em
camundongos submetidos à tolerância ao LPS e à sepse por ligadura e punção
cecal

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo
2017

Joleen Lopes Machado

Estudo sobre a produção e a ação dos peptídeos antimicrobianos em
camundongos submetidos à tolerância ao LPS e à sepse por ligadura e punção
cecal

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências
Programa de Ciências Médicas
Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2017

Dedicatória

Minha eterna GRATIDÃO a vocês e ao universo.

“Nossa conquista”

Ao meu chefe Prof. Soriano por sua generosidade, cuidado, tolerância e por ter
segurado na minha mão.

Minha Japinha (Suely Ariga), o que fizeste por mim SOMENTE Anjos escolhidos
a dedos pelo Deus soberano.

Thais obrigada pelo acolhimento doou o seu tempo e coração. Pode esperar
lealdade para com você, assim como meu eterno respeito e consideração.

Acolhimento e cuidado fraternal.

AGRADECIMENTOS

Tive uma segunda oportunidade de evolução espiritual e emocional.

A **Deus** toda honra e glória pela renovação do meu ser. Pela misericórdia e amparo emocional de todos os dias, presença viva em todos os momentos restaurando a minha **FÉ**.

Ao **Yoga**, que faz de mim uma pessoa motivada a buscar o equilíbrio: corpo-mente-espírito. De um jeito ou de outro uma coisa é certa, o yoga acalma a mente e fortalece o corpo físico, emocional e espiritual.

Aos meus pais **Dinair e Barbosa** e irmãos **Diego e Brenda**. **Gratidão!** A minha afilhada **Anna Clara** - minha alegria.

Meus avós **Natividade e Zé Lopes** pelo amor genuíno.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano** pela solidariedade, cuidado fraternal, oportunidade de chegar até aqui. Estendo-lhe minhas mãos, segure-as se precisar. E, obrigada por tudo!

Ao professor **Dr. Heraldo Possolo de Souza** por todas as oportunidades oferecidas, pelo carinho, apoio e generosidade, Sinto uma infinita gratidão pelo privilégio de ter conhecido o senhor.

Ao **Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco**, por permitir minha pesquisa no LIM 51. À **Suely Ariga** a quem Deus me apresentou como **AMIGA**, doou o seu tempo, disposição, carinho maternal e auxílio nos experimentos, suporte emocional diário. Agradeço tudo que fizeste por mim, por me ouvir, Por me fazer sorrir! E outras coisas que aprendi com você. Obrigada por existir!

À **Thais Martins Lima**, Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer você com o devido merecimento. Sua ajuda e seu apoio foram para mim de valor inestimável. Apenas posso me expressar através da limitação de meras palavras, e com elas lhe prestar esta humilde, mas sincera, homenagem. Pelo resto da minha vida lhe agradecerei!

À **Vanessa Victorino** minha “bruxinha” amada que esteve ao meu lado reerguendo-me e por tantas vezes sendo meu ombro amigo de perto e de longe. Sabedoria compartilhada.

À **Anne Assunção** obrigada pelo suporte espiritual, acolhimento em vários momentos difíceis. Nada é por acaso nesta vida!

Ao **Wermerson Barroso** nossos momentos estarão eternizados na minha Alma. Obrigada pelas diversas alegrias compartilhadas e pelo apoio em um momento vital.

À **Kelli Gouveia** obrigada por segurar a minha mão, uma irmã que Deus me apresentou.

À **Rose** você me acolheu no seu lar, me apresentou a sua família linda. Minha paulista que eu adoro; **Por este olhar que diz: “Amigo, vá em frente e enfrente!”**

As secretárias **Angélica** e **Rose**, meus anjos da pós-graduação. Muita Luz na vida de vocês!

Aos amigos do LIM 51 **Isabela, Vivian, Ester, Ricardo, Graça, Fátima, Geraldo, Dona Maria, Mariana Macedo, Márcia Koike** vocês tornaram o ambiente mais feliz. Todos tem um lugar no meu coração!

Ao tio **Hermes** e tia **Denise** momentos vividos e eternos. Pelos abraços carinhosos e acolhedor.

Aos amigos Igor, Afonso, André, Rosa e Angélica obrigada pelo carinho, generosidade e muitos momentos compartilhados.

Ao **Laboratório de Imunofisiologia (LIF-UFMA)**, vocês fazem parte desta conquista. **Gratidão; Prof. Marcus Paes** em minhas preces diárias, agradeço a Deus por sua vida.

Ao **Biotério de Manutenção do LIM 51 – Disciplina de Emergências Clínicas**, sobre responsabilidade do biólogo **Antônio dos Santos Filho**.

À **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** e ao programa de **Emergências Clínicas**, por fornecerem as condições para a realização deste trabalho, e aos professores e funcionários dessa instituição, por todo o suporte necessário e cordialidade.

À **CAPES**- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.

“Só é lutador quem sabe lutar consigo mesmo.”

Carlos Drummond de Andrade

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% = Porcentagem

± = Mais ou menos

≤ = Menor igual

AMPs= Peptídeos antimicrobianos

AP= proteína ativadora

BPI= proteína bactericida/aumento de permeabilidade

CLP – ligação e perfuração cecal

Cm= centímetro

CD – do inglês “Cluster of differentiation” traduzido por conjunto de diferenciação

CT- animais tolerantes submetidos à CLP

CRAMP- Cathelicidin Antimicrobial Peptide

c-Fos= família de proteínas que dimeriza com Jun para produzir AP-1

c-Jun= fator de transcrição

DC- células dendríticas

DNA- ácido desoxirribonucléico

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPM – erro padrão da média

ET- tolerância a endotoxina

HBD-2- beta-defensina humana

hCAP18- human- Cathelicidin Antimicrobial Protein 18

HIV/AIDS -Vírus da Imunodeficiência Humana

HNP- peptídeos de neutrófilos humanos

IL- Interleucina

IFN-γ – interferon gama

IRF3— fator 3 de regulação do interferon

Kg- Kilograma

LBP – proteína ligante de lipopolissacarídeo

LPS – Lipopolissacarídeo

LL-37- Leucina-leucina 37

MyD88 – proteína citosólica ativada pelo toll

mg = Miligrama

mL = Mililitro

mM = Milimolar

mm³ = Milímetros cúbicos

mmHg = Milímetros de Mercúrio

MAPK- Mitogen Activated Protein Kinases

mRNA- RNA mensageiro

MHC- complexo de histocompatibilidade

MMP- do ingles “Matriz Metalloproteinases” traduzido por metalloproteinase de matriz

NK- célula natural killer

NF- κ B – fator de transcrição nuclear – κ B

NO- óxido nítrico

PAMP – padrão molecular associado ao patógeno

PRR- receptor de reconhecimento padrão

PCO₂- pressão parcial de CO₂

RT-PCR- reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA- ácido ribonucleico

Rpm= rotações por minuto

SIRS – síndrome da resposta inflamatória sistêmica

STAT = transdutor de sinal e ativador de transcrição

SOFA- *Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment*

TLR – receptor do tipo *toll*

TRIF – proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de interferon β

TOL- animais induzidos à tolerância com injeções de LPS

TGF-beta- fator de transformação do crescimento- β ;

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

UTI – unidade de terapia intensiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A estrutura de um receptor Toll-like humano (TLR).....	5
Figura 2: Vias de sinalização do receptor Toll-like.....	6
Figura 3: Modo de ação de AMPs.....	10
Figura 4: Esquema do modelo experimental de sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) em camundongos... ..	18
Figura 5: Concentrações de β defensina- 1, β defensina-3 e CRAMP no plasma dos animais dos animais 6 horas após a indução de CLP.....	23
Figura 6: Concentrações de α defensina -1, α defensina -7, β defensina- 1, β defensina-3, CRAMP no baço dos animais 6 horas após a indução de CLP.....	25
Figura 7: Concentrações de α defensina -1, α defensina -7, β defensina- 1, β defensina-3, CRAMP no pulmão dos animais 6 horas após a indução de CLP... ..	26
Figura 8: Concentrações de α defensina -1, α defensina -7, β defensina- 1, β defensina-3, CRAMP no intestino dos animais 6 horas após a indução de CLP.	27
Figura 9: Concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 no baço dos animais 6 horas após a indução de CLP	28
Figura 10: Concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 no pulmão dos animais 6 horas após a indução de CLP.....	29
Figura 11: Concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 no intestino dos animais 6 horas após a indução de CLP.....	30
Figura 12: Resumo dos resultados	31

Machado JL. *Estudo sobre a produção e a ação dos peptídeos antimicrobianos em camundongos submetidos à tolerância ao LPS e à sepse por CLP* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Resumo

Os peptídeos antimicrobianos são importantes ferramentas do sistema imune inato para controle das infecções e recentemente tem sido investigado seu potencial como estratégia terapêutica nas infecções e sepse. Estes peptídeos apresentam diversas atividades decorrentes de mecanismos de ação antimicrobianas e imuno estimuladoras. A indução de tolerância com a administração de pequenas doses de LPS reduz a mortalidade em modelos animais de sepse, modulando diversos aspectos do sistema imune. Nossa hipótese neste estudo foi que o efeito protetor da tolerância ao LPS está relacionado com a modulação da produção dos peptídeos antimicrobianos na sepse. A tolerância ao LPS foi induzida em camundongos C57bl/6 por injeção de lipopolissacarídeo de *E. coli* na dose de 1mg/kg por cinco dias. No oitavo dia os animais foram eutanasiados por overdose anestésica ou submetidos ao modelo de ligadura e punção cecal. Após seis horas os animais foram eutanasiados por overdose anestésica e o sangue, baço, intestino e pulmões foram coletados para determinação das concentrações de citocinas e peptídeos antimicrobianos. Nossos resultados mostram que o efeito da tolerância ao LPS sobre a produção de peptídeos antimicrobianos é tecido específica. Sistemicamente (plasma) a tolerância aumenta a concentração plasmática de β defensina-3 e CRAMP somente em animais submetidos à CLP. No baço ocorre redução de α defensinas 1 e 7 pela CLP e também pela tolerância. No pulmão há elevação de β defensinas 1 e 3 pela CLP e esta é revertida pela tolerância. No intestino ocorre redução de defensinas pela tolerância tanto em animais controle quanto em animais submetidos à CLP. Observamos em nosso estudo um padrão invertido entre as concentrações de peptídeos antimicrobianos e citocinas no intestino e baço dos animais, principalmente nos submetidos à CLP. Quanto maior a concentração da citocina no tecido, menor a concentração da defensina em questão. No intestino podemos observar que a tolerância e a CLP aumentam a concentração de IL-6 e IL-10 e diminuem as concentrações de α defensinas 1 e 7. No baço observamos esse padrão entre α defensina-7 e IL-6 e entre α defensina-1 e TNF- α . Não foi possível encontrar esse tipo de correlação no pulmão. Concluímos que os efeitos protetores da tolerância ao LPS estão relacionados com uma menor produção de defensinas no baço, pulmão e intestino de animais submetidos à sepse, e com maior concentração de peptídeos antimicrobianos no plasma.

Descritores: sepse, citocinas, defensinas, lipopolissacarídeos, pulmão, intestinos, baço, camundongos.

Machado JL. *Study on the production and action of antimicrobial peptides in mice submitted to LPS tolerance and to sepsis by CLP* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Abstract

Antimicrobial peptides are important tools of the innate immune system to control infections and its potential as a therapeutic strategy in infections and sepsis has recently been investigated. These peptides present both antimicrobial and immuno-stimulatory activities. Lipopolysaccharide (LPS) tolerance is a defense mechanism against invading microorganisms also widely distributed in nature. Induction of tolerance with the administration of small doses of LPS reduces mortality in animal models of sepsis, modulating several immune system aspects. Our hypothesis was that the protective effect of LPS tolerance is related to the modulation of antimicrobial peptide production in sepsis. LPS tolerance was induced in C57bl / 6 mice by injection of *E. coli* LPS at 1mg / kg for five days. On the eighth day the animals were submitted to the sepsis model of cecal ligation and puncture. After six hours the animals were euthanized by anesthetic overdose and blood, spleen, intestine and lungs were collected for the determination of cytokines and antimicrobial peptides concentrations. Our results show that the effect of LPS tolerance on the production of antimicrobial peptides is tissue specific. LPS tolerance increases the plasma concentration of β -defensin-3 and CRAMP only in animals undergoing CLP. In the spleen, there is reduction of α defensins 1 and 7 by CLP and also by tolerance. In the lung, there is elevation of β defensins 1 and 3 by PLC and this is reversed by tolerance. In the intestine, there is reduction of defensins by tolerance in both control and CLP animals. In our study, we observed an inverted pattern between the concentrations of antimicrobial peptides and cytokines in the intestine and spleen of animals, especially those submitted to CLP. The higher the cytokine concentration in the tissue, the lower the concentration of defensin in question. In the gut we can observe that tolerance and CLP increases IL-6 and IL-10 concentration and decreases α defensins 1 and 7 concentrations. In the spleen, we observed this pattern between α -defensin-7 and IL-6 and between α -defensin-1 and TNF- α . It was not possible to find this type of correlation in the lung. We conclude that the protective effects of LPS tolerance are related to a lower production of defensins in the spleen, lung and intestine of animals submitted to sepsis, and with a higher concentration of antimicrobial peptides in plasma.

Descriptors: Sepsis, cytokines, defensins, lipopolysaccharides, lung, intestines, spleen, mice.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. Revisão de literatura	1
1.1. Sepses.....	1
1.1.1. Fisiopatologia da sepsis.....	3
1.2. LPS - sinalização intracelular	4
1.2.1. Tolerância ao LPS: mecanismo evolutivo de resistência à infecção e autolesão	7
1.3. Peptídeos antimicrobianos	8
1.4. Papel das AMPs na Sepsis.....	13
2. Hipótese.....	16
3. Objetivos.....	17
3.1 Geral.....	17
3.2 Específicos.....	17
4. Material e Métodos.....	18
4.1. Animais	18
4.2. Modelo Experimental de Tolerância	19
4.3. Modelo de Ligadura e Punção Cecal.....	19
4.4. Extração protéica das amostras de tecido.....	20
4.5. Quantificação de citocinas	20
4.6. Quantificação de Peptídeos Antimicrobianos por ELISA	21
4.7. Análise Estatística.....	21
5. Resultados	22
5.1. Efeito da tolerância ao LPS na concentração de peptídeos antimicrobianos	22
5.1.1. Plasma.....	23
5.1.2. Baço.....	24
5.1.3. Pulmão.....	26
5.1.4. Intestino	27

5.2. Efeito da tolerância ao LPS na concentração de citocinas.....	28
5.2.1. Baço.....	28
5.2.2. Pulmão.....	29
5.2.3. Intestino.....	30
5.2.4. Resumo dos resultados.....	31
6. Discussão.....	32
6.1. Efeitos sistêmicos da indução de tolerância.....	32
6.2. Efeitos da indução de tolerância em órgãos.....	33
6.2.1. Pulmão.....	33
6.2.2. Intestino	36
6.2.3. Baço.....	37
6.3. Interações encontradas entre as concentrações de AMPs e citocinas	38
7. Conclusões	40
8. Conclusão final	40
9. Referências Bibliográficas	41

1. Revisão de literatura

1.1. Sepses

A sepsis é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta do hospedeiro desregulada à infecção por microorganismos tais como: bactérias gram-negativas, gram-positivas, fungos e vírus (Singer et al., 2016; Shankar-Hari et al., 2016; Seymour et al., 2016). Trata-se de uma das mais importantes complicações infecciosas da medicina contemporânea, tanto por sua incidência quanto por sua gravidade, e há um grande potencial de evolução para o óbito dependendo do estágio na qual foi estabelecido o diagnóstico (Hotchkiss, Kar, 2003; Martin, 2006b; Silva et al., 2006; Siqueira-Batista, 2009a). Diagnóstico, características demográficas e definições de sepsis evoluíram nos últimos 30 anos.

Devido à grande variabilidade na nomenclatura e definições de sepsis, ocorreu em 1992 a Primeira Conferência de Consenso de Sepsis (Bone et al., 1992) que tentou homogeneizar e simplificar o conceito da (Levy et al., 2003). Neste consenso foram associados sinais de infecção e de síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS). A SIRS compreende uma grande variedade de insultos que incluem uma temperatura corporal maior que 38°C ou inferior a 36°C; uma frequência cardíaca superior a 90 batimentos por minuto, taquipnéia, manifestada por uma taxa respiratória superior a 20 respirações por minuto, como indicado por uma PCO₂ arterial inferior a 32 mmHg; e uma alteração na contagem de glóbulos brancos, como uma contagem maior do que 12 000 / mm³, ou menor de 4000 / mm³, ou a presença de mais de 10% de neutrófilos imaturos (Bone et al., 1992).

Em 2001, uma segunda conferência de consenso revalidou os conceitos anteriores, mas chamou a atenção para o fato de que a resposta inflamatória sistêmica não é específica da sepsis e pode ser vista em muitas doenças, como trauma ou pancreatite (Levy et al., 2003). Em suas formas mais intensas, a sepsis grave e o choque séptico estão associados a taxas de mortalidade de 40 a 60% (Vincent, 2000), tornando essa condição extremamente importante do ponto de vista dos cuidados clínicos e da saúde pública (Martin et al., 2003a).

A terceira conferência internacional de consenso foi realizada em 2016 e definiu a sepsis como uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção que

leva a uma disfunção de órgãos potencialmente fatal. Em termos operacionais, a disfunção de órgãos pode ser representada por um aumento de 2 ou mais no índice SOFA [*Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment*], o que está associado com uma mortalidade hospitalar maior de 10%. O choque séptico é definido como um subconjunto de sepse em que alterações circulatórias, celulares e metabólicas profundas estão associadas a um maior risco de mortalidade do que a sepse sozinha. Pacientes com choque séptico podem ser identificados clinicamente pela necessidade de vasopressores para a manutenção da pressão arterial em 65 mmHg de mercúrio e níveis de lactato sérico maiores que 2 mmol/L (>18 mg/dL) na ausência de hipovolemia. Essa combinação está associada com taxas de mortalidade hospitalares maiores que 40% (Singer et al., 2016).

A sepse evolui frequentemente para a disfunção de um ou mais órgãos e aumenta o risco de morte entre 15 – 20% para cada órgão que entra em falência. As disfunções orgânicas mais frequentes são: neurológica, respiratória, renal, hepática e hematológica (Pérez, Foncea, 2000; Linde-Zwirble, Angus, 2004). Afeta também os sistemas cardiovascular, endócrino e imunológico (Martin, 2012c).

A sepse possui altas taxas de mortalidade em níveis mais graves do que câncer de mama, câncer de próstata e HIV/AIDS combinados (Chaudhry, 2014). Atualmente, a incidência de sepse é avaliada em 437 casos por 100 000 na população dos EUA. As admissões para sepse aumentaram e ultrapassaram as de síndrome coronariana aguda ou acidente vascular cerebral (Fleischmann et al., 2016). Isso resulta em 750. 000 mortes por ano e é responsável por quase US \$ 20 bilhões em custos anuais de saúde, representando 5,2% dos custos associados às internações (Kempker, Martin, 2016). No entanto, embora a incidência de sepse grave continue a aumentar, a mortalidade diminuiu de 22,2 para 17,3% em um estudo epidemiológico realizado nos EUA entre 2008 e 2012 (Franck et al., 2017).

A sepse, apesar de se tratar de uma condição clínica extremamente frequente na prática clínica, ainda se mantém enigmática sob diferentes pontos de vista. De fato, há pontos bastante obscuros em relação à fisiopatologia, à acurácia diagnóstica, à terapêutica e ao prognóstico – os quais se relacionam ao

desconhecimento de muitos aspectos do sistema imunológico, para os quais novas investigações deverão, nos próximos anos, elucidar (Siqueira-Batista, 2012b).

1.1.1. Fisiopatologia da sepse

A sepse é caracterizada por uma desregulação inflamatória exibida após uma infecção. A resposta imunológica é realizada pela sucessão dos mecanismos inatos e adaptativos, ou seja, nas fases iniciais da infecção há um predomínio das respostas inatas e nas fases mais tardias os linfócitos passam a gerar respostas imunes adaptativas. A principal diferença entre estes dois tipos de resposta é que a resposta imune adaptativa é altamente específica e é memorizada. O desenvolvimento de clones diferenciados em células efetoras leva de 3 a 5 dias. Este período de tempo é o bastante para que as bactérias produzam sérios danos ou a morte do hospedeiro. Por outro lado, os mecanismos efetores da imunidade inata (peptídeos antimicrobianos, fagócitos e via alternativa do complemento) são ativados imediatamente depois da invasão. A resposta imunológica inata utiliza sistemas de reconhecimento primitivos e inespecíficos, que permitem sua ligação a muitos produtos microbianos (Kourilsky, Truffa-Bachi, 2001).

Os microorganismos possuem componentes estruturais especiais conhecidos como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPS). Os PAMPS são comuns a diversos antígenos e entre eles são conhecidos o LPS, o ácido lipoteicóico, peptidoglicanos, fragmentos de DNA bacteriano, fragmentos de DNA e/ou RNA viral, flagelina, zimosan, taxol, etc. (Triantafilou et al., 2002).

Essas moléculas estranhas presentes nos microorganismos interagem com receptores das células hospedeiras, conhecidos como receptores tipo Toll (TLRs). Esses receptores estão presentes nas membranas de diversos tipos celulares, principalmente dos leucócitos (Shukla et al., 2014).

Quando ocorre dano tecidual com exposição à microorganismos, os TLRs são ativados e se inicia uma cascata inflamatória para tentar conter essa infecção. Ao serem expostas a um *burst* desses mediadores secretados por macrófagos, as células endoteliais sofrem ativação, causando a liberação de

citocinas, moléculas pró-coagulantes, fator ativador de plaquetas e NO, levando a quebra da barreira endotelial (Hack, Zeerleder, 2001).

As alterações vasculares promovem a migração de neutrófilos e fagócitos para o tecido infectado, além de levar ao aumento da permeabilidade vascular, alterações do tônus vascular, trombose microvascular, coagulação intravascular, resultando em disfunção orgânica e lesão (Hack, Zeerleder, 2001; Remick, 2007; Shukla et al., 2014).

1.2. LPS - sinalização intracelular

O LPS é o principal componente da membrana bacteriana gram-negativa e está sob investigação experimental desde a sua descoberta em 1894 por um médico alemão, Richard Friedrich Johannes Pfeiffer, que inventou o termo "Endotoxina" (Fildes, Pfeiffer, 1956).

É o padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) mais estudado, conhecido por suas ações através do Toll-like receptor-4 (TLR4). O TLR4 é um tipo de receptor de reconhecimento de padrão (PRR) expresso nas células do sistema imunológico inato (Kawasaki, Kawai, 2014) e foi o primeiro membro da família a ser caracterizado em mamíferos (Poltorak et al., 1998).

Uma proteína de fase aguda produzida no fígado, a proteína de ligação a lipopolissacarídeos (LBP), medeia o passo decisivo do reconhecimento de LPS por ligação à porção lipídeo A do mesmo, formando um complexo LPS-LBP (Schumann et al., 1990).

Este complexo é então reconhecido pelo receptor Cluster de Diferenciação 14 (CD14), uma molécula de superfície que também é conhecida por formar um complexo terciário (Haiman et al., 1994), ajudando a apresentar o LPS para o TLR4 (Takeda, Akira, 2005).

O TLR-4 é capaz de ativar vias de sinalização distintas que envolvem diferentes cofatores e moléculas adaptadoras, intermediando diversas respostas imunes (Figura 1). Uma das vias de sinalização é a "via de sinalização TLR dependente de MyD88" (proteína citosólica ativada pelo *toll*) que é ativada pela ligação direta do domínio TIR citoplasmático com a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP), que recruta a molécula adaptadora MyD88 e quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAKs) (Kawai, Akira, 2006).

Após autofosforilação das IRAKs, a proteína adaptadora associada ao receptor de TNF (TRAF6) interage com complexos de proteínas, ativando o complexo I κ B-quinase (IKK) e por fim, ativando o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). A ativação de NF- κ B leva à transcrição de diversas citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1- β e IL-6 (Kawai, Akira, 2006; Anas et al., 2010).

Figura 1: A estrutura de um receptor Toll-like humano (TLR). TLRs humanos são proteínas transmembrânicas do tipo I com um domínio de repetição extracelular rico em leucina (LRR) e um citoplasmático, referido como domínio do receptor Toll/IL-1 (TIR), que é homólogo ao do receptor de IL-1. Adaptado de Sandor e Buc, 2005.

A outra via de sinalização, a “via de sinalização independente de MyD88” envolve a proteína adaptadora contendo domínio TIR indutora de interferon β (TRIF) ou a molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM), que levam à fosforilação do fator 3 de regulação do interferon (IRF3), induzindo produção de interferon e moléculas co-estimulatórias (Medzhitov, 2001; Kawai, Akira, 2006; O’Neill , Bowie, 2007).

A transcrição induzida pelo fator AP-1 (proteína ativadora) é tipicamente composta de proteínas de c-Fos e c-Jun e nos linfócitos está implicada, por exemplo, na expressão do gene IL-2 e outros genes imunologicamente relevantes (Frantz et al., 2007), (Figura 2).

Figura 2: Vias de sinalização do receptor Toll-like. LPS entregue pelo CD14 ao TLR4/MD-2 inicia uma cascata de sinalização através do domínio TIR e das moléculas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM, que podem ativar algum dos fatores de transcrição NFκB, IRF5, AP1 e/ou IRF3. AP1, proteína ativadora 1; IκB, inibidor do fator nuclear κB; IKKα, quinase α do IκB; IKKβ, quinase β do IκB; IKKγ, quinase γ do IκB; IRAK1, quinase 1 associada ao receptor de IL-1; IRAK4, quinase 4 associada ao receptor de IL-1; IRF3, fator 3 regulatório do interferon; IRF5, fator 5 regulatório do interferon; JNK, quinase c-jun N-terminal; LPS, lipopolissacarídeo; MyD88, proteína de resposta primária a diferenciação mielóide; NFκB, fator nuclear κB; RIP1, proteína 1 de interação com o receptor; TAB1, proteína 1 de ligação à TAK-1; TAB2-3, proteínas 2 e 3 de ligação à TAK-1; TAK1 (M3K7), quinase 1 ativada pelo fator de crescimento e transformação β; TBK1, proteína serina-treonina quinase; TIRAP, proteína adaptadora contendo domínio TIR; TLR4, receptor Toll-like 4; TRAF6, fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral; TRAM, molécula adaptadora relacionada à TRIF; TRIF, adaptador contendo domínio TIR indutor de interferon β; Ub, ubiquitina; UB2V1, variante 1 da enzima E2 conjugada a ubiquitina; UBE2N, enzima E2N conjugada a ubiquitina. Adaptado de Frantz et al., 2007.

A ativação dos receptores TLR4 pode desencadear diversas vias de sinalização, como MAPK, AP-1, STAT, IRF3 levando a expressão de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (Raetz, Whitfield, 2002).

Embora a detecção de patógenos pelas células da imunidade inata desencadeiem uma reação inflamatória robusta e essencial, esse processo precisa ser rigorosamente regulado, pois a inflamação excessiva pode levar a danos extensos nos tecidos, como os que observamos nos quadros de sepse. Nesse domínio, destaca-se o fenômeno da tolerância ao LPS (Siqueira-Batista, 2012).

1.2.1. Tolerância ao LPS: mecanismo evolutivo de resistência à infecção e autolesão

As adaptações fisiopatológicas para regular a inflamação exagerada servem como mecanismo importante para a proteção do hospedeiro contra o choque de endotoxinas e um dos exemplos clássicos de um mecanismo de proteção é a tolerância à endotoxina (Dobrovolskaia, Vogel, 2002; Fan, Cook, 2004; Cavaillon, Adib-Conquy, 2006; Biswas, 2007; Foste et al., 2007). Neste fenômeno as células ou organismos expostos a baixas concentrações de endotoxina entram em um estado transiente não respondente e são incapazes de responder a novos desafios com a endotoxina.

As fases inicial e tardia de tolerância apresentam características diferentes após a injeção inicial do LPS. A fase inicial pode ser detectada dentro das primeiras 24 horas depois de exposição ao LPS e pode durar até 8 dias. A tolerância ao LPS relaciona-se à produção e liberação reduzida de citocinas pelos fagócitos em re-exposição ao LPS. Além disso, foi demonstrado que a exposição prévia ao LPS resulta em alteração de padrão de expressão gênica das citocinas (Staudt, 2001).

Um dos exemplos clínicos mais relevantes de tolerância a endotoxina é o observado nos leucócitos de pacientes com sepse. Monócitos circulantes de pacientes com sepse produzem quantidades muito menores de TNF α , IL-6, IL-1 α , IL-1 β e IL-12 quando expostos a LPS *in vitro*, quando comparados a monócitos de indivíduos saudáveis (Munoz et al., 1991a; Munoz et al., 1991; Monneret et al., 2008b; Draisma et al., 2009;). Ao mesmo tempo produzem mais IL-10, TGF β e IL-1RA (Monneret et al., 2004a; Cavaillon et al., 2006; Draisma et al., 2009). Foi demonstrado também que monócitos de pacientes com sepse expressam menos MHC de classe II, CD86 e CIITA (Manjuck et al., 2000; Pachot et al., 2006).

Inicialmente foi proposto que a tolerância seria uma resposta imune benéfica, entretanto as evidências sugerem-na como um marcador de desregulação imune, complicando o manejo de pacientes em sepse severa, visto que a imunoparalisia aumenta a susceptibilidade a re-infecções (Wolk et al., 2000; Biswas et al., 2007; Saeed et al., 2014). Estudos mostraram que existe uma

assinatura gênica de tolerância que está associada à piora no prognóstico dos pacientes (Hotchkiss et al., 2013; Pena et al., 2014; Davenport et al., 2016) e com maior incidência de infecções secundárias em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

No entanto, existem também evidências na literatura de que o pré-tratamento com ligantes clássicos de TLR4, como LPS e monofosforil lipídio A (MPLA), aumentam a resistência do hospedeiro a infecções ao mesmo tempo em que diminuem a produção de citocinas em diversos modelos (Lehner et al., 2001; Romero et al., 2011; Murphey et al., 2011; Ariga 2014).

Dentre os múltiplos mecanismos que controlam a extensão e duração da inflamação induzida pela sinalização através dos receptores Toll-like (TLR), encontram-se a inibição destes receptores por reguladores negativos, a produção de citocinas anti-inflamatórias e alterações da sinalização TLR. Estes eventos estão diretamente ligados ao fenômeno da tolerância. Esta adaptação da resposta imune inata está relacionada também a mecanismos epigenéticos, ou seja, a regulação específica não é devido ao mecanismo de sinal específico e sim é gene-específica através de modificações na cromatina (Foster et al. 2007).

1.3. Peptídeos antimicrobianos

Como descrito anteriormente, a resposta imune inata é essencial para o reconhecimento de agentes invasores e início do combate à infecção. Ela compreende não só a ativação de leucócitos residentes nos tecidos, mas também a ativação de mecanismos como a cascata do complemento e a liberação dos peptídeos antimicrobianos.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs, de *antimicrobial peptides*) são uma família de pequenos polipeptídeos expressos nos organismos de forma constitutiva ou indutível (Xia et al., 2017). São conhecidos por serem ferramentas multifuncionais do sistema imune inato responsáveis pelo combate a infecções bacterianas (Pulido et al., 2012). Além disso, são considerados como sendo alternativas aos antibióticos convencionais.

Estes peptídeos apresentam uma série de atividades, incluindo não apenas a atividade antimicrobiana. Diversas propriedades imunoestimuladoras

foram detectadas, incluindo migração celular, sobrevivência e proliferação, indução de mediadores antimicrobianos e imunes, como citocinas/quimiocinas, cicatrização de feridas e angiogênese (Hiemstra et al., 2016).

Os AMPs são amplamente distribuídos em invertebrados, plantas e animais superiores, incluindo o corpo humano (Brown et al., 2011). São expressos em uma variedade de tipos celulares, tais como monócitos, neutrófilos, células epiteliais, e queratinócitos (Pinheiro da Silva, Machado, 2013b). São importantes moléculas naturais imunologicamente ativas que foram preservadas nos organismos durante o longo processo evolutivo (Xia et al., 2017).

São moléculas anfipáticas, predominantemente pequenas (10-50 aminoácidos), geralmente diferem na sequência e estrutura. Com base na sua composição de aminoácidos e estrutura secundária podem ser divididos em quatro grupos: (i) peptídeos α -helicoidais, (ii) peptídeos em folha β estabilizados por duas a quatro ligações dissulfídicas, (iii) estruturas estendidas e (iv) peptídeos com ligações dissulfídicas (Ganz; Lehrer, 1998; Hancock, 2006; Jenssen et al., 2006).

A ação antimicrobiana direta é conseguida pela ruptura de membranas celulares bacterianas ou sua translocação em bactérias para afetar alvos internos (Hancock, Sahl, 2006). Foi demonstrado que os AMPs possuem como alvo uma diferença entre a organização das membranas dos microrganismos e dos animais. As membranas bacterianas têm na face extracelular da bicamada lipídica alto conteúdo de fosfolipídeos carregados negativamente (Wenzel, 2002). Por outro lado, a face extracelular da membrana plasmática dos animais é composta majoritariamente por fosfolipídeos neutros, como fosfatidicolina e esfingomielina, contudo os fosfolipídeos aniônicos, como fosfatidilserina e fosfatidilglicerol, estão voltados para o interior da célula (Hancock, 1995; Matsuzaki et al., 1997; Lehrer, 1998,). Além disso, o colesterol nas membranas animais impede a adesão dos AMPs, proporcionando baixa toxicidade para células do hospedeiro (Hancock 1995; Lehrer et al., 1998a). Supõe-se que a formação de poros e a permeabilização da membrana de forma não específica levam a uma ruptura da membrana (Figura 3). A seguir diferentes modos de ação pelo qual esses peptídeos alteram as membranas (Figura 3).

Figura 3: Modo de ação de AMPs. (A) No modelo toroidal, os peptídeos agregam e induzem as monocamadas lipídicas a se dobrar continuamente através do poro, de modo que ambos os peptídeos inseridos e os grupos de cabeça lipídica alinhem o núcleo da água. (B) No modelo tipo-carpet, as cadeias peptídicas cobrem a superfície das membranas de uma maneira semelhante a um tapete e a dissolve como um detergente para além de uma concentração limiar para a qual é necessária uma proporção alta de peptídeo-lipídeo. (C) No modelo canal transmembrânico, os peptídeos se ligam à membrana celular, então os próprios peptídeos se inserem no núcleo hidrofóbico da membrana formando um poro, causando vazamento de material citoplasmático e morte da célula. (D) No modelo de canal agregado, os peptídeos inserem na membrana e depois se agrupam em agregados não estruturados que abrangem a membrana. Esses agregados são propostos para ter moléculas de água associadas a eles, fornecendo canais para vazamento de íons e, possivelmente, moléculas maiores através da membrana (Li et al., 2012).

Os AMPs mais investigados nos mamíferos são as defensinas e catelicidinas.

As defensinas, constituídas pelos subgrupos alfa e beta, são produzidas por células intestinais de Paneth, neutrófilos, macrófagos (Lehrer, Ganz, 1999b), células epiteliais, células epiteliais da mucosa e queratinócitos (Yang et al, 2004). Alguns AMPs são constitutivamente expressos, enquanto outros podem ser induzidos em resposta à inflamação [por exemplo, os peptídeos de neutrófilos humanos (HNP) 1-3, beta-defensina humana (HBD) -2] (Easton et al., 2009. A ativação de TLR em si resulta em liberação de AMPs, bem como na liberação de citocinas e quimiocinas, isso, por sua vez, ativa MAPK e NF- κ B.

As defensinas estão surgindo como moléculas terapêuticas contra patógenos em sepse devido ao largo espectro de suas propriedades antimicrobianas. Nas últimas décadas grande número de defensinas e os seus análogos foram rastreados, estruturalmente modificados, e sintetizados. No entanto, a maioria desses estudos são realizados *in vitro* e não se sabe muito sobre os papéis *in vivo* destas moléculas (Xie et al., 2014).

Além das propriedades bactericidas, diversas propriedades imunomoduladoras das defensinas já foram descritas. Dados da literatura mostram que HBD-2 parece ser um agente quimiotático para células que expressam o receptor de quimiocinas humano CCR6 (Yang et al., 1999). (CCR6 é preferencialmente expresso por células dendríticas imaturas (DCs) e células T CD8+ que possuem o fenótipo de memória (Kondo et al., 2007). Além disso, o HNP 1-3 é quimiotático para monócitos, DC imaturos e células T CD4+ e CD8+ (Territo et al., 1989; (Yang et al., 2000b). Além disso, induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- λ , IL-6 e IL-10 por células T, bem como TNF- α e IL-1 β por monócitos (Lehrer, Ganz, 2002c; Froy, 2005; Esses processos contribuem para a maturação das células dendríticas, que vinculam o sistema imune inato e adaptativo. A estimulação com TNF- α contribui para esta maturação. As células dendríticas ativam células T CD4+ (e seus subconjuntos) e células T CD8+, bem como células B. Por sua vez, os monócitos podem ser induzidos por um peptídeo para se diferenciar em DC (Stephens et al., 2008).

As catelicidinas são produzidas por proteólise do terminal C dos seus precursores. Nos seres humanos, apenas um precursor, hCAP18, é produzido principalmente em leucócitos e células epiteliais e forma o peptídeo LL-37. Nos roedores a catelicidina mais conhecida é o CRAMP (peptídeo antimicrobiano relacionado a catelina) (Gallo et al., 1997).

As catelicidinas podem estimular ou inibir vias de sinalização em diversas doenças. Entre seus efeitos no sistema imune, elas participam da secreção de citocinas por macrófagos murinos (Pinheiro da Silva et al., 2009a), alteram respostas quimiotáticas (Yang et al., 2000b), apoptose (Ren et al., 2012) ativação de inflamassoma (Salzer et al., 2014) e fagocitose (Wang et al., 2014).

Além de suas funções antimicrobianas, LL-37 tem diversos papéis imunomoduladores. De fato, tanto funções pró quanto anti-inflamatórias já foram

descritas, e isso parece depender do microambiente e da doença em estudo. Por exemplo, a presença de LL-37 durante a diferenciação de monócitos para macrófagos *in vitro* leva a uma resposta pró-inflamatória, com diminuição da expressão de IL-10 e aumento de IL-12p40. Além disso, LL-37 direciona a plasticidade de macrófagos em diferenciação para o fenótipo M1 (Van der Does et al., 2010) sugerindo que esse peptídeo tem um grande efeito na produção de citocinas. Com relação a efeitos anti-inflamatórios, estudos mostraram que o LL-37 inibe a sinalização via TLR4 tanto por sequestrar o seu ligante, o LPS (Larrick et al., 1995; Barlow et al., 2011), como também por impedir a sinalização do complexo receptor/ligante em células dendríticas e macrófagos (Di Nardo et al., 2007; Brown et al., 2011). Isso resultaria em menor produção de citocinas quando LPS e LL-37 estão presentes simultaneamente.

No entanto, quando os macrófagos são pré-estimulados com LPS antes de serem expostos a LL-37 há uma maior produção de TNF- α (Scott et al., 2002a). Além disso, essa pré-estimulação ativa o inflamassoma e a produção de IL-1b e IL-18 após a estimulação com LL-37 (Scott et al., 2002a; Elssner et al., 2004). *In vivo*, camundongos deficientes para LL-37 apresentaram maior sobrevivência quando submetidos a modelo de infecção por bactérias, com modulação da produção de citocinas e aumento da infiltração de neutrófilos para o sítio infeccioso (Severino et al., 2017). Já quando os animais deficientes foram submetidos a choque endotoxêmico, não foi observada diferença na mortalidade (Lai et al., 2011). Assim, a habilidade do LL-37 em ter efeito imunossupressivo depende tanto do tempo quanto do contexto onde as células foram expostas ao mesmo.

LL-37 também modula as respostas imunes dependentes de interferons (IFN) tipo I. Os IFN tipo I promovem a maturação de células dendríticas e a ativação de linfócitos e células NK (Stetson, Medzhitov, 2006). Sua síntese pelas células dendríticas imaturas ocorre após o reconhecimento de ácidos nucleicos de patógenos pelos TLR7 e TLR9. Essas vias normalmente não são ativadas por DNA próprio do hospedeiro, pois existem mecanismos de degradação e inibição de captação. Como o LL-37 tem alta afinidade por ácidos nucleicos, ele se liga ao DNA e age como um carreador de ácidos nucleicos através da membrana (Zhang et al., 2010b). Desse modo, DNA acoplado com LL-37 é internalizado por

células dendríticas, induzindo a produção de IFN de tipo I e a maturação dessas células. Assim, as interações de LL-37 com o DNA podem promover a perda da tolerância ao DNA próprio, levando a síntese de IFN tipo I, o que levaria a respostas imunes exageradas após a exposição a DNA.

1.4. Papel das AMPs na Seps

Estudos de AMPs em pacientes com seps grave ou choque séptico são limitados. Foram investigados os níveis de BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) e da proteína de ligação a LPS (LBP) em pacientes com abscessos, peritonite ou fluidos corporais não infectados. A relação BPI / LBP foi significativamente elevada em abscessos em comparação com peritonites e fluidos peritoneais não infectados. Além disso, a concentração de BPI foi maior em abscessos com organismos Gram positivos em comparação com aqueles com organismos Gram-negativos. Os autores concluíram que o BPI pode atenuar a resposta inflamatória local e a toxicidade sistêmica das endotoxinas liberadas durante infecções gram-negativas (Opal et al., 1994). Um estudo posterior no mesmo ano investigou os níveis de BPI na superfície de leucócitos polimorfonucleares, BPI plasmática e LBP plasmática em voluntários humanos normais que receberam LPS de *Escherichia coli* e em pacientes com seps e infecções Gram-negativas. Em comparação com os controles, voluntários desafiados com LPS e pacientes com seps exibiram maiores concentrações de BPI na superfície de leucócitos polimorfonucleares e LBP plasmática (Calvano et al., 1994; Rintala et al., 2000 investigaram níveis de BPI e taxas de BPI / neutrófilos em 42 controles saudáveis e 34 pacientes com seps grave. Devido a uma associação entre diminuição da pressão arterial e níveis de BPI, os autores concluíram que a BPI pode indicar a gravidade da disfunção orgânica na seps (Rintala et al., 2000).

Um estudo determinou concentrações de β -defensina humana (HBD) -1, HBD-2 e catelicidina LL-37 / hCAP-18 em aspirados traqueais de recém-nascidos ventilados mecanicamente. As concentrações de AMPs correlacionaram-se entre si e com níveis de interleucina-8 e TNF- α no líquido de lavagem broncoalveolar. Infecções pulmonares ou sistêmicas foram associadas com concentrações significativamente aumentadas de HBD-1, HBD-2 e LL-37

(Schaller-Bals et al., 2000). Um estudo posterior investigou o efeito da super-expressão de BD-2 sobre lesão pulmonar para avaliar se a função de BD-2 no pulmão pode ser atribuída tanto à ação antimicrobiana quanto a modulação da resposta imune. Para tanto, adenovírus recombinantes portadores de um cassete de expressão de BD-2 de rato ou adenovírus controle que transportam um vetor vazio foram administrados intratraquealmente a ratos Sprague-Dawley. Após 48 h, a lesão pulmonar aguda foi induzida por infecção por *Pseudomonas aeruginosa* ou por ligadura e punção cecal (CLP). As quantidades de *P. aeruginosa* no pulmão com super-expressão de BD-2 foram significativamente menores em comparação com as dos controles. Além disso, a super-expressão de BD-2 reduziu o dano alveolar e edema intersticial e também melhorou significativamente a taxa de sobrevivência (Shu et al., 2006).

Um estudo prospectivo de casos controles investigou os níveis de HBD-2 em 16 pacientes com sepse grave. Os níveis plasmáticos de HBD-2 em pacientes sépticos foram significativamente maiores em comparação com os controles saudáveis e pacientes críticos, mas não sépticos. Além disso, o estudo mostrou que a expressão de mRNA de HBD-2 após a estimulação com endotoxina foi significativamente diminuída em leucócitos de pacientes com sepse grave em comparação com controles saudáveis e pacientes não sépticos, o que pode contribuir para a disfunção imunológica complexa em pacientes com sepse grave (Book et al., 2007).

A contradição entre a diminuição da expressão da HBD-2 nas células do sangue periférico de pacientes com sepse grave e os níveis elevados de HBD-2 no plasma séptico pode sugerir que, além das células do sangue periférico, células endoteliais circulantes ou células reticuloendoteliais (por exemplo, monócitos ou macrófagos) podem ser uma possível fonte de HBD-2 *in vivo* (Book et al., 2007).

Um estudo prospectivo transversal e longitudinal em uma UTI pediátrica de hospital universitário das crianças investigou a liberação sistêmica de HNP 1-3 endógena e lactoferrina em crianças com sepse grave. Os pacientes sépticos apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de HNP 1-3 e de lactoferrina em comparação com pacientes não sépticos. Além disso, as concentrações plasmáticas de HNP 1-3 e de lactoferrina correlacionaram-se com

a contagem total de glóbulos brancos e neutrófilos. Embora o aumento das concentrações plasmáticas de lactoferrina tenha sido observado com o desenvolvimento de insuficiência orgânica, não houve associação entre a concentração plasmática de HNP 1-3 e a falência ou desfecho de órgãos. Esta observação é enfraquecida pelo fato de que outros mediadores como citocinas e radicais de nitrito não foram medidos. Além disso, as concentrações de lactoferrina não diferiram entre não sobreviventes e sobreviventes e não se correlacionaram com o tipo de patógeno (Thomas et al., 2002). O aprimoramento e a adesão dos neutrófilos no tecido danificado podem servir como uma possível explicação para a correlação entre a concentração de lactoferrina e a falência orgânica. Além disso, níveis elevados de lactoferrina foram detectados em pacientes com ativação do complemento (Wolach et al., 1984).

Apesar de sua descoberta em 1939, ainda é raro a aplicação de AMPs na prática clínica (Martin et al., 2015). Sua crescente relevância nos últimos anos se deve à sua capacidade de superar a crescente resistência aos antibióticos, que decorre da sua capacidade de diminuir a pró-inflamação, matar bactérias e estimular a imunidade inata (Hancock, Sahl, 2006; Hamill et al., 2008; Easton et al., 2009). Nas últimas décadas grande número de defensinas e os seus análogos foram rastreados, estruturalmente modificados, e sintetizados. No entanto, a maioria desses estudos são realizados *in vitro* e não se sabe muito sobre os papéis *in vivo* destas moléculas (Xie et al., 2014).

2. Hipótese

Fundamentação: o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da sepse ainda é um grande foco de estudos. Os peptídeos antimicrobianos são importantes ferramentas do sistema imune inato para combater a infecções. A indução de tolerância com a administração de pequenas doses de LPS reduz a mortalidade em modelos animais de sepse, modulando diversos aspectos do sistema imune.

Hipótese: o efeito protetor da tolerância ao LPS está relacionado com a modulação da produção dos peptídeos antimicrobianos na sepse.

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o efeito da tolerância ao LPS sobre a produção de peptídeos antimicrobianos em um modelo animal de infecção bacteriana.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito da tolerância ao LPS na concentração de peptídeos antimicrobianos.

Estratégia: Quantificamos a concentração de α -defensina 1, α -defensina -7, β -defensina- 1, β -defensina-3 e CRAMP no baço, pulmão, intestino e plasma dos animais 6 horas após a indução de CLP.

- Avaliar o efeito da tolerância induzida por LPS na concentração de citocinas.

Estratégia: Quantificamos a concentração de TNF- α , IL-6 e IL-10 no baço, pulmão e intestino dos animais 6 horas após a CLP.

4. Material e Métodos

4.1. Animais

Foram selecionados camundongos C57BL/6 machos com seis semanas de idade, pesando entre 20 e 25 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os camundongos foram mantidos em gaiolas em local com temperatura e ciclo de luz controlado, recebendo água e comida a vontade. Os animais permaneceram durante o experimento no Biotério de Manutenção do LIM 17 – Disciplina de Reumatologia, sob responsabilidade do biólogo Antônio dos Santos Filho.

Os procedimentos foram realizados de acordo as regras institucionais para o cuidado de animais de laboratório e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº 014/16.

Os animais foram divididos em grupos e denominados como entre parênteses: controle (CTL) que receberam apenas salina, tolerantes (TOL) receberam LPS, os que foram submetidos apenas CLP (CLP) e os que foram submetidos à tolerância e CLP (CT).

O desenho experimental esquema abaixo.

4.2. Modelo Experimental de Tolerância

Foi administrada injeção intraperitoneal de Lipopolissacarídeo (de *Escherichia coli* – Sorotipo 026: B6/ Sigma) na dose de 1mg/kg por cinco dias. No oitavo dia os animais foram eutanasiados por overdose anestésica em uma associação de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) ou submetidos ao modelo de ligadura e punção cecal.

4.3. Modelo de Ligadura e Punção Cecal

O modelo de ligadura e punção cecal (CLP) foi selecionado para este estudo porque se assemelha ao que ocorre na evolução da sepse humana (Lehrer et al., 1988a; Hancock, Sahl, 2006). A Figura 4 ilustra o procedimento realizado.

Figura 4: Esquema do modelo experimental de sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP) em camundongos (Buras et al., 2005).

Sob condições assépticas, uma laparotomia mediana de 2 cm foi realizada para permitir a exposição do ceco e intestino adjacente. O ceco foi firmemente ligado com uma sutura de seda 3.0 na sua base, a seguir a válvula íleo-cecal foi perfurada duas vezes com uma agulha de calibre 18 (superior e inferior). O ceco foi cuidadosamente espremido para expulsar uma pequena quantidade de fezes a partir dos locais de perfuração. O ceco foi devolvido para a cavidade peritoneal e a laparotomia foi fechada com suturas de seda 4.0 (Soriano et al., 2002).

Após seis horas os animais foram eutanasiados por overdose anestésica com uma mistura de cetamina (80mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg), intraperitonealmente (i.p). Em seguida o sangue, baço, intestino e pulmões foram coletados e armazenados em refrigeração a -80°C para análises posteriores.

Este mesmo procedimento de eutanásia e obtenção de órgãos foi realizado com os animais dos grupos controle e tolerante.

4.4. Extração protéica das amostras de tecido

A extração proteica do baço, intestino (íleo) e pulmão foi realizada com a pulverização em graal de aço inoxidável e pistilo de cerâmica com nitrogênio líquido e ressuspensos em 1 ml de tampão de lise de proteínas (NP40- NP40 10%; glicerol 10%; NaCl 135mM; Tris 20mM; PMSF 1mM). As amostras foram homogenizadas em agitador tipo gangorra por 1 hora em gelo e centrifugadas a 10000 rpm por 40 minutos a 4°C (Jeremias et al., 2015).

O sobrenadante foi coletado e acondicionado em tubos a -80°C até o momento das dosagens. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford.

4.5. Quantificação de citocinas por ELISA

As concentrações de citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram quantificadas no baço, intestino e pulmão utilizando kits comerciais conforme instruções do fabricante (DuoSet kit, R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA).

Inicialmente, na placa com 96 poços, foram adicionados 100 μ L por poço do anticorpo de captura na concentração determinada pelo fabricante. Após incubação de aproximadamente 18 horas a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e a placa lavada 3 vezes com o tampão de lavagem ($\pm$ 300 μ L por poço). Em seguida, foi realizada a reação de bloqueio adicionando-se 200 μ L por poço de albumina sérica bovina a 1% em PBS e a placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente (20 a 26°C). Novamente, foi realizado o procedimento de lavagem por 3 vezes, adicionando 100 μ L por poço do padrão e das amostras, procedendo-se à incubação da placa por 2 horas à temperatura ambiente. Após repetir o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100 μ L por poço do anticorpo de detecção biotinilado na concentração determinada pelo

fabricante. A placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Ao término da incubação, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e, em seguida, adicionaram-se 100µL por poço da enzima estreptoavidina peroxidase na proporção 1:200 de enzima:PBS com 0,05% de tween-20; incubação por 1 hora à temperatura ambiente e protegida da luz. Em seguida, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação revelada pela adição de 100µL por poço de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e incubação de 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi bloqueada adicionando-se 50µL por poço de H₂SO₄ (1N), avaliando-se a densidade óptica das amostras a 450 nm.

Os resultados obtidos de concentração das citocinas foram corrigidas pela quantidade de proteína por mg de tecido.

4.6. Quantificação de Peptídeos Antimicrobianos por ELISA

As concentrações de α-defensina 1, α-defensina -7, β-defensinas, β-defensina- 1, β-defensina-3 e CRAMP foram quantificadas no baço, intestino e pulmão utilizando kits comerciais conforme instruções do fabricante (MyBiosource). Os resultados obtidos foram corrigidos pela quantidade de proteína por mg de tecido.

No plasma dos animais foram dosadas β -defensina- 1, β-defensina-3 e CRAMP devido à quantidade de amostras necessária.

4.7. Análise Estatística

As análises foram realizadas com N = 6. Todos os valores foram apresentados em $media \pm erro\ padrão\ da\ média$ ($M \pm SEM$). Para a análise estatística utilizamos InStat Statistical Software (GraphPad, Software Inc., San Diego, Calif). As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por ANOVA com pós-teste de Newmans Keuls. Quando avaliamos o efeito isolado da tolerância na CLP foi utilizado o teste t-Student. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1. Efeito da tolerância ao LPS na concentração de peptídeos antimicrobianos

Para avaliar o efeito da tolerância induzida por LPS na produção de peptídeos antimicrobianos no modelo de sepse por ligadura e punção cecal (CLP) foram quantificados pela técnica de ELISA as concentrações de α defensina-1, α defensina-7, β defensina-1, β defensina-3, CRAMP.

5.1.1. Plasma

A concentração de peptídeos antimicrobianos no plasma foi determinada 6 horas após a indução da sepse por ligadura e punção cecal (CLP).

Podemos observar que a tolerância ao LPS diminui significativamente a concentração da β defensina-1 em animais controle. Quando os animais são submetidos à CLP, observamos uma tendência de diminuição de β defensina-1, β -3 e CRAMP, embora não significativa. Os animais tolerantes ao LPS submetidos à CLP apresentaram aumento significativo na concentração plasmática de β defensina-3 e CRAMP quando comparados aos animais CLP (Figura 5).

Figura 5: Concentrações de β defensina- 1, β defensina-3 e CRAMP no plasma dos animais dos animais 6 horas após a indução de CLP. CTL: animais controle; TOL: animais induzidos a tolerância com injeções de LPS 1mg/kg por 5 dias; CLP: animais submetidos ligadura e perfuração cecal; CT: animais tolerantes e submetidos a CLP. a $p<0.05$ quando comparado ao grupo CTL; b $p<0.05$ quando comparado ao grupo CLP.

5.1.2. Baço

A indução de tolerância não alterou a concentração das defensas avaliadas no baço dos animais controle.

Observamos diminuição na concentração de α defensina-1 e α -7 no baço dos animais tolerantes que foram submetidos à CLP quando comparados aos animais controle (Figura 6A e 6B). A concentração de α -defensina1 nos animais tolerantes foi significativamente inferior a encontrada nos animais submetidos a CLP. Não houve diferença na concentração de α -7 entre os grupos submetidos à CLP.

Não houve diferença na concentração de β defensina- 1, β defensina-3 e CRAMP no baço dos animais.

Figura 6: Concentrações de α defensina -1, α defensina -7, β defensina- 1, β defensina-3, CRAMP no baço dos animais 6 horas após a indução de CLP. CTL: animais controle; TOL: animais induzidos a tolerância com injeções de LPS 1mg/kg por 5 dias; CLP: animais submetidos ligadura e perfuração cecal; CT: animais tolerantes e submetidos a CLP. a $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CTL; b $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP

5.1.3. Pulmão

Não encontramos alteração significativa na concentração das defensinas estudadas no pulmão dos animais após a indução de tolerância ao LPS.

A CLP induziu aumento significativo na concentração de β defensinas 1, e esse efeito foi revertido nos animais que eram tolerantes ao LPS (Figura 7C).

Não houve diferença na concentração de α defensina -1, α defensina -7, β defensina-3 e CRAMP no pulmão dos animais

Figura 7: Concentrações de α defensina -1, α defensina -7, β defensina- 1, β defensina-3, CRAMP no pulmão dos animais 6 horas após a indução de CLP. CTL: animais controle; TOL: animais induzidos a tolerância com injeções de LPS 1mg/kg por 5 dias; CLP: animais submetidos ligadura e perfuração cecal; CT: animais tolerantes e submetidos a CLP. a $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CTL; b $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP.

5.1.4. Intestino

A indução de tolerância diminuiu a concentração das α defensina-7 e β defensina-1 no intestino dos animais controle.

A CLP diminuiu significativamente a concentração das α defensina-1 e α -7. Quando a CLP foi induzida em animais tolerantes houve uma diminuição mais intensa de α -1, mas não de α defensina-7 (Figura 8A e 8B).

Não houve diferença na concentração de β defensina-3 e CRAMP no intestino dos animais.

Figura 8: Concentrações de α defensina -1, α defensina -7, β defensina- 1, β defensina-3, CRAMP no intestino dos animais 6 horas após a indução de CLP. CTL: animais controle; TOL: animais induzidos a tolerância com injeções de LPS 1mg/kg por 5 dias; CLP: animais submetidos ligadura e perfuração cecal; CT: animais tolerantes e submetidos a CLP. a $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CTL; b $p < 0.05$.

5.2. Efeito da tolerância ao LPS na concentração de citocinas

Para avaliar o efeito da tolerância induzida por LPS na resposta inflamatória quantificamos a concentração de TNF- α , IL-6 e IL-10 no baço, pulmão e intestino dos animais 6 horas após a CLP.

5.2.1. Baço

A indução de tolerância não alterou a concentração das citocinas avaliadas no baço dos animais controle.

Observamos que a CLP aumentou a concentração de IL-6 no baço dos animais 6 horas após a cirurgia, e a tolerância não alterou esse efeito (Figura 9B).

Não houve alteração significativa na concentração de TNF- α e IL-10 nos animais operados, embora haja uma tendência de aumento nos animais tolerantes.

Figura 9: Concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 no baço dos animais 6 horas após a indução de CLP. CTL: animais controle; TOL: animais induzidos a tolerância com injeções de LPS 1mg/kg por 5 dias; CLP: animais submetidos ligadura e perfuração cecal; CT: animais tolerantes e submetidos a CLP. a $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CTL; b $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP

5.2.2. Pulmão

Observamos que a tolerância diminuiu a concentração de TNF- α e IL-10 no pulmão de animais submetidos à CLP quando comparados somente com estes (teste t) (Figura 10A e 10C).

A CLP aumentou a concentração de IL-6 no pulmão dos animais, mas não houve efeito da tolerância nesse modelo experimental (Figura 10B).

Figura 10. Concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 no pulmão dos animais 6 horas após a indução de CLP. CTL: animais controle; TOL: animais induzidos a tolerância com injeções de LPS 1mg/kg por 5 dias; CLP: animais submetidos ligadura e perfuração cecal; CT: animais tolerantes e submetidos a CLP. a $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CTL; b $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP.

5.2.3. Intestino

A indução de tolerância ao LPS levou a uma diminuição da concentração de TNF- α , IL-6 e IL-10 no intestino dos animais controle, no entanto somente a diminuição de IL-6 foi significativa. (Figura 11) ou (11A,11B e 11C).

A CLP levou ao aumento significativo de TNF- α e IL-6 em relação ao grupo controle. Os animais tolerantes submetidos à CLP mostraram um aumento ainda maior na concentração intestinal dessas citocinas. A tolerância também aumentou a concentração de IL-10 no intestino de animais submetidos à CLP.

Figura 11: Concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 no intestino dos animais 6 horas após a indução de CLP. CTL: animais controle; TOL: animais induzidos a tolerância com injeções de LPS 1mg/kg por 5 dias; CLP: animais submetidos ligadura e perfuração cecal; CT: animais tolerantes e submetidos a CLP. a $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CTL; b $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP.

5.2.4. Resumo dos resultados

GRUPOS ÓRGÃOS	TOL	CLP	TOL+CLP
Plasma	↓ β1	-	↑↑↑ CRAMP
Pulmão	-	↑ β 1 ↑ IL6	↓ TNF ↑ IL6 ↓ IL10
Baço	-	↓ α7 ↑ IL6	↓ α1 ↓ α7 ↑ IL6
Intestino	↓ α7 ↓ β 1 ↓ IL6	↑ TNF-α ↑ IL6 ↓ α7 ↓ α 1	↓ α1 ↓ α7 ↓ β 1 ↑ IL6 ↑ TNF-α ↑ IL10

Figura 12: Resumo dos resultados. Citocinas e Defensinas quantificados por grupo e órgão.

6. Discussão

Peptídeos antimicrobianos são importantes componentes do sistema imune inato, cuja produção está envolvida no combate a agentes invasores, como bactérias, vírus e fungos. Os AMPs têm uma combinação única de qualidades anti-inflamatórias, antimicrobianas e imunoestimulantes (Hancock, Sahl, 2006; Hamill et al., 2008; Easton et al., 2009). Os peptídeos antimicrobianos previnem e controlam infecções microbianas tanto por ação antimicrobiana direta como por modulação da resposta imune inata (Zaio et al., 2002; Zanetti et al., 2004; Braff et al., 2005; Easton et al., 2009). A ação antimicrobiana direta é conseguida pela ruptura das membranas celulares bacterianas ou sua translocação para afetar alvos internos (Hancock, Sahl, 2006).

A tolerância ao LPS é capaz de conter a inflamação exacerbada observada no choque séptico. Avaliamos se seu efeito protetor estava relacionado com a modulação da produção desses peptídeos antimicrobianos.

6.1. Efeitos sistêmicos da indução de tolerância

Embora sejam conhecidos há mais de 100 anos, existem pouquíssimos estudos sobre os AMPs na sepse. Existem poucos artigos que avaliaram a concentração de AMPs no plasma de pacientes com sepse, e todos encontraram aumento da concentração dos mesmos nos doentes (Thomas et al., 2002; Berkestet et al., 2010; Olbrich et al. 2013).

Um estudo prospectivo investigou os níveis de β -defensina 2 humana (HBD-2) em 16 pacientes com sepse grave. Os níveis plasmáticos de HBD-2 em pacientes sépticos foram significativamente maiores em comparação com os controles saudáveis e pacientes criticamente doentes não sépticos. Por outro lado, a expressão de mRNA de HBD-2 estimulada por endotoxina foi significativamente reduzida por macrófagos de pacientes com sepse em comparação com os dos outros grupos. Os autores sugerem que os resultados conflitantes entre concentração do peptídeo no plasma e a produção de mRNA *ex vivo* de HBD-2 indica que as células endoteliais ou células reticuloendoteliais (por exemplo, monócitos ou macrófagos) também sejam fonte de HBD-2 *in vivo* (Book et al., 2007). Outra explicação seria a imunodepressão da sepse, onde se

verificam níveis elevados de citocinas plasmáticas, porém baixa produção de citocinas por estímulo *ex vivo* (Munoz et al., 1991a; Munoz et al., 1991b).

A indução de tolerância normalmente reduz a produção de mediadores que sustentam ou amplificam a inflamação (por exemplo: TNF- α , IL-1 β), contudo mantem a capacidade do organismo em fagocitar e combater bactérias e outros agentes invasores (Ariga et al. 2014, De Lima 2014). Nossos resultados plasmáticos mostram uma resposta aumentada da β defensina-3 e do CRAMP no grupo tolerante submetido à CLP, sugerindo que uma maior concentração de AMPs também auxiliaria na capacidade de eliminação de bactérias (Figura 5).

6.2. Efeitos da indução de tolerância em órgãos

As defensinas são peptídeos secretados primariamente para defesa local de tecidos, em particular tecidos expostos a contato com bactérias. Assim, as defensinas ajudam na primeira barreira contra agentes invasores. As análises em tecidos são difíceis de serem realizadas em estudos clínicos com humanos. Nossos dados mostram que há padrões distintos na produção de peptídeos antimicrobianos e citocinas nos tecidos avaliados.

6.2.1. Pulmão

A superfície epitelial dos pulmões é exposta a um grande número de microrganismos potencialmente patogênicos que são inalados. Vários mecanismos de defesa protegem o pulmão contra infecção e a produção de peptídeos antimicrobianos é uma delas (Tecle et al., 2010). Células epiteliais que revestem as vias aéreas, as glândulas submucosas e as células epiteliais alveolares produzem uma gama de peptídeos antimicrobianos que variam em estrutura e atividade. Além disso, AMPs produzidos por leucócitos também atuam no tecido pulmonar. As defensinas de neutrófilos [HNP (peptídeos de neutrófilo humano) 1-4] são α -defensinas que são armazenadas nos grânulos azurofílicos de neutrófilos em grandes quantidades (5% da proteína total do neutrófilo). Embora a morte intracelular pós-fagocitose de microrganismos seja considerada a função principal dos peptídeos antimicrobianos, esses peptídeos também são lançados no ambiente extracelular após estimulação e, portanto, podem afetar a função das células epiteliais que revestem o trato respiratório

(Van Wetering et al., 2005b). As defensinas de neutrófilos apresentam atividade citotóxica em células eucarióticas, incluindo células epitelial (Lichtenstein et al., 1986; Aarbiou et al., 2006b) mas em concentrações mais baixas elas também podem aumentar a proliferação como demonstrado, por exemplo, em fibroblastos e células epiteliais (Murphy et al., 1993; Aarbiou et al., 2004a). Quando instilado intra-traquealmente nas vias aéreas de camundongos, os peptídeos diminuem a função pulmonar e aumentam a inflamação (Zhang, et al., 2001a). Este efeito pode ser em parte o resultado da sua capacidade de aumentar a produção de quimiocinas pelas células epiteliais das vias aéreas (van Wetering et al., 1997a). O grupo de Hiemstra et al, 2016 desmonstrou a atividade mitogênica de defensinas em células epiteliais em cultura, e demonstrou que as defensinas aumentam o fechamento da ferida em culturas de células epiteliais brônquicas, um efeito que foi acompanhado por sua atividade mitogênica e quimiotática, como também induz a produção de mucinas nessas células (Aarbiou et al., 2004a). Além desses efeitos sobre células estruturais do pulmão, as defensinas dos neutrófilos também são quimioatrativas para leucócitos.

As β -defensinas humanas diferem ligeiramente das α -defensinas no espaçamento e conectividade das suas cisteínas (Cole et al., 2002). HBD-2 e -3 são secretadas em resposta ao LPS e citocinas (TNF- α , IL-1 β) e são ativas contra bactérias gram-positivas (HBD-3) e gram-negativas (HBD-1, -2 e -3), enquanto a HBD-1 é regulada positivamente pelo IFN- γ (Mathews et al., 1999; Harder et al., 2000a; Liu et al., 2002a). Mac Redmond et al., 2005 mostraram que as células epiteliais do pulmão humano expressam TLR4 em sua superfície e a estimulação destas células com LPS de *Pseudomonas* resulta em aumento da expressão do gene e da proteína HBD-2 (Macredmond et al., 2005). Todas as três β defensinas foram identificadas no pulmão e mostraram atuar de forma sinérgica com outras proteínas de imunidade inata para destruir as bactérias (Travis et al., 1999). As β -defensinas diferem em suas atividades antimicrobianas. *Staphylococcus aureus* é resistente à ação de HBD-1 e HBD-2, mas mesmo cepas multirresistentes desse microrganismo são sensíveis à morte induzida por HBD-3 (Harder et al., 2001b).

Em nosso modelo observamos que a CLP estimulou somente a produção de defensinas (especificamente do tipo β) no pulmão dos animais. (Figuras 7C,

7D). Um estudo clínico determinou concentrações de HBD-1, HBD-2 e cathelicidina LL-37 / hCAP-18 em aspirados traqueais de recém-nascidos ventilados mecanicamente. As concentrações de AMPs correlacionaram-se entre si e com níveis de interleucina-8 e TNF- α no líquido do lavado broncoalveolar. A ocorrência de infecções pulmonares ou sistêmicas foram associadas com concentrações significativamente aumentadas de HBD-1, HBD-2 e LL-37 nestes pacientes (Schaller-Bals et al., 2002).

Sabemos que a inflamação pulmonar derivada da CLP é um dos principais fatores que comprometem a funcionalidade deste tecido na doença, e se deve ao grande influxo de neutrófilos para o (Perl et al., 2011). Seria esperado, portanto, um aumento na concentração de α -defensinas no pulmão desses animais. A ausência de alteração se deve ao fato de que neutrófilos de camundongos não expressarem α -defensinas (Eisenhauer, Leher, 1992).

A indução de tolerância impediu o aumento de β -defensinas no pulmão dos animais submetidos à CLP, o que sugere uma menor atividade microbicida neste tecido. No entanto, a tolerância diminuiu a concentração de TNF- α no tecido, evidenciando um efeito anti-inflamatório e, consequentemente protetor, da tolerância no pulmão dos animais (Figuras 7 e 10 A). Nosso grupo demonstrou recentemente esse efeito anti-inflamatório da tolerância no pulmão de animais submetidos à CLP (Ariga et al., 2014). Neste estudo também mostramos a menor migração de leucócitos para o pulmão dos animais devido à modulação da expressão de moléculas de adesão. Este efeito pode ser responsável pela diminuição da concentração de β -defensinas no pulmão dos animais tolerantes, visto que essas defensinas também são expressas por leucócitos (Zhao et al., 1996, Duits et al., 2002), portanto seu aumento após a CLP não se deve somente a produção pelas células epiteliais, mas também pelo infiltrado leucocitário.

Nossos dados mostram que o efeito anti-inflamatório da tolerância no pulmão não se deve ao aumento na produção dos peptídeos antimicrobianos avaliados.

6.2.2. Intestino

A mucosa intestinal e os fatores associados do sistema imunológico funcionam como uma primeira linha de defesa contra agentes patogênicos oportunistas do intestino, prevenindo a invasão e colonização do tecido por microrganismos que poderiam prejudicar o hospedeiro. Entre os fatores que contribuem para a saúde da mucosa estão α -defensinas produzidas pelas células de Paneth, células epiteliais especializadas localizadas na base das criptas do intestino delgado (Porter et al., 2002). A liberação desses AMPs para a luz da cripta evita a invasão microbiana no microambiente da cripta. Nos camundongos as α -defensinas atingem concentrações pelo menos 1000 vezes mais elevadas do que a concentração microbicida *in vitro*, indicando o papel das α -defensinas para manter a esterilidade da cripta e proteger as células tronco intestinais (Cheng, 1981).

Diversos estudos apontam disfunção nas células de Paneth associadas à doença do intestino irritado e outras condições inflamatórias do intestino (Tamboli et al., 2004; Shi 2007; Simmonds et al., 2014) mostrou que o íleo de pacientes com doença de Crohn apresentam menor concentração de α -defensinas, e isso se deve à perda das células epiteliais devido à inflamação no tecido, e não seria a causa das anormalidades encontradas nesses pacientes. No nosso estudo encontramos diminuição das α -defensinas no intestino de animais submetidos à CLP (Figura 8A, 8B)) Como encontramos também maior concentração de TNF- α e IL-6 (Figuras 11A, 11B) nestes tecidos, podemos sugerir que a menor concentração de α -defensinas se deva à lesão inflamatória e perda da integridade do epitélio. Quando avaliamos o efeito da tolerância, observamos que a indução da tolerância levou a diminuição do conteúdo dessas defensinas e aumento das citocinas pró-inflamatórias nos animais submetidos à CLP. A tolerância *per se* não foi pró-inflamatória no intestino, visto que não há alteração das citocinas nos animais somente tolerantes. No entanto, o estudo de (Vandenbroucke et al., 2014) mostra que o LPS ativa a MMP7 no intestino de camundongos, e conseqüentemente, leva a ativação de diversas α -defensinas. Estas, além de seus conhecidos efeitos antibacterianos, também são capazes de ativar macrófagos por vias independentes do TLR-4, e desse modo amplificam a inflamação local do intestino, levando a quebra da barreira intestinal

e subsequente inflamação sistêmica. Podemos sugerir que a tolerância levou a micro lesões no intestino dos animais, mas estas só foram significativamente deletérias quando o animal sofreu um grande insulto, como a CLP. Serão necessários estudos histológicos e de outros parâmetros inflamatórios para podermos esclarecer nossos achados neste tecido.

6.2.3. Baço

A literatura não tem muitos dados sobre os peptídeos antimicrobianos em baço de animais com sepse, apesar do mesmo ser um importante órgão do sistema imune. Somente o trabalho de Volrats et al., (2011) investigou o papel do baço na sepse induzida por *Streptococcus pneumoniae* e verificou aumento na concentração de β defensina 2 no baço dos animais.

No nosso estudo observamos um padrão de redução de α defensinas no baço dos animais na presença de CLP (Figuras 6A, 6B). Este padrão foi mantido ou ampliado nos animais tolerantes submetidos à CLP. Embora a concentração de β defensinas no baço seja superior ao observado nos outros tecidos avaliados, o que era esperado devido à quantidade de células imunológicas presentes no mesmo, não houve diferença entre os grupos.

No baço temos fenômenos diferentes aos outros órgãos, pois as citocinas são elevadas para aumentar a produção de células imunológicas que são requeridas para o foco infeccioso. Normalmente encontramos nos baços de animais submetidos à sepse além de linfócitos uma grande quantidade de neutrófilos. Por outro lado, as células migram do baço para a infecção, não contribuindo para o aumento local de defensinas.

6.3. Interações encontradas entre as concentrações de AMPs e citocinas.

Observamos em nosso estudo um padrão invertido entre as concentrações de AMPs e citocinas no intestino e baço dos animais, principalmente nos submetidos à CLP.

No intestino dos animais podemos observar que a tolerância e a CLP criaram um padrão invertido nas concentrações de α defensinas 1 e 7 com IL-6 e IL-10. Embora a concentração de CRAMP não tenha sido alterada de forma significativa, observamos esse padrão invertido também entre a concentração

de CRAMP e IL-10. Quanto maior a concentração da citocina no tecido, menor a concentração da defensina em questão. No baço dos animais observamos esse padrão entre α defensina-7 e IL-6 e entre α defensina-1 e TNF- α . Não foi possível encontrar esse tipo de correlação no pulmão.

Podemos atribuir esses resultados ao fato de que, além de proteger de infecções por destruir os microorganismos, os AMPs exibem atividades imunomoduladoras.

O estudo realizado por Scott et al., 2011b mostrou que a catelicidina humana LL-37 inibe a produção de IL-8 induzida por LPS em monócitos. B. Fatoumata et al. mostrou que o AMP hepcidina inibe a geração de citocinas pró-inflamação, tais como IL-6 e IL-1 β . Usando RT-PCR, Nagaoka et al., 2001 mostrou que a β defensina humana 2 reduziu a produção de TNF- α . As catelicidinas CAP18 e CAP11 foram investigados por Nagaoka et al., 2001 Estes AMPs podem se ligar ao LPS e inibem a expressão de TNF- α por macrófagos RAW 264.7 (Suzuki et al., 2011). CP29 e indolicidina bloqueiam a sinalização inflamatória do LPS ao competir com o LBP pela ligação ao LPS, reduzindo significativamente a liberação de TNF- α (Liu et al., 2011b).

Dados de Miles et al. (2009) mostraram que as α -defensinas secretadas por neutrófilos humanos na inflamação crônica podem inibir a secreção de múltiplas citocinas pró-inflamatórias, agindo como um importante mecanismo anti-inflamatório envolvido na prevenção de danos teciduais. Além disso, os dados de experimentos com camundongos knockout destacam o efeito anti-inflamatório das β -defensinas. Camundongos knockout para β -defensina 1, quando comparados com animais selvagem, morreram antes da infecção por influenza, além de exibirem um maior infiltrado inflamatório no início da doença, indicando que a β -defensina 1 desempenha um papel crítico no controle da inflamação (Ryan, Diamond, 2010).

Entre os mecanismos propostos para explicar o efeito inibitório dos AMPs sobre a inflamação induzida pelo LPS está o sequestro do mesmo em micelas. Kaconis et al., 2011 usou uma variedade de técnicas de biofísica, como microscopia eletrônica de fratura congelada e dispersão de raios-X de ângulo pequeno de radiação síncrotron (SAXS), para estudar a neutralização do LPS por uma série de peptídeos sintéticos. O trabalho sugere que a capacidade de

formar micelas multilamelares de LPS correlaciona-se diretamente com a inibição da produção de citocinas estimulada pelo LPS (Kaconis et al., 2011). Da mesma forma, usando crio-microscopia eletrônica de transmissão (Cryo-TEM), Chen et al., 2007 observou que o LPS puro exibe fibrilas com formas cilíndricas. No entanto, na presença do peptídeo G12.21, que pode neutralizar LPS de forma eficiente, a estrutura do LPS muda para estruturas multilamelares bem-dispostas Chen et al., 2007. Estes AMPs podem promover a formação de agregados maciços de LPS, o que facilita a fagocitose dos mesmos por macrófagos, evitando a ativação de receptores celulares e a secreção de citocinas.

Esses trabalhos mostram um importante papel anti-inflamatório dos AMPs. Quando há uma maior quantidade de defensinas no tecido ocorre um maior clearance de bactérias, o que reduz o estímulo continuado de TLR e produção de citocinas. Nosso estudo mostra uma maior concentração de citocinas inflamatórias nos tecidos após a CLP concomitantemente com diminuição dos AMPs. No entanto, não podemos afirmar se a lesão inflamatória induzida pela CLP causou danos estruturais que diminuíram a produção dos AMPs, ou se a diminuição dos AMPs facilitou o aumento na concentração das citocinas.

7. Conclusões

O efeito da tolerância ao LPS sobre a produção de AMPs é tecido específica.

Sistemicamente (plasma) a tolerância aumenta a concentração plasmática de β defensina-3 e CRAMP somente em animais submetidos à CLP.

No baço ocorre redução de α defensinas 1 e 7 pela CLP e também pela tolerância.

No pulmão houve elevação de β defensinas 1 e 3 pela CLP e esta foi revertida pela tolerância.

No intestino ocorre redução de defensinas pela tolerância tanto em animais controle quanto em animais submetidos à CLP.

8. Conclusão final

Os efeitos protetores da tolerância ao LPS estão relacionados com uma menor produção de defensinas no baço, pulmão e intestino de animais submetidos à sepse, e com maior concentração de peptídeos antimicrobianos no plasma.

9. Referências Bibliográficas

- Aarbiou J, Tjabringa GS, Verhoosel RM, Ninaber DK, White SR, Peltenburg LT, Rabe KF, Hiemstra PS. Mechanisms of cell death induced by the neutrophil antimicrobial peptides alpha-defensins and LL-37. *Inflamm Res*. 2006; 55(3):119-27.
- Aarbiou J, Verhoosel RM, van Wetering S, de Boer WI, van Krieken JH, Litvinov SV, Rabe KF, Hiemstra PS. Neutrophil Defensins Enhance Lung Epithelial Wound Closure and Mucin Gene Expression in Vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; (30):193–201.
- Anas AA, Wiersinga WJ, de Vos AF, van der Poll T. Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. *Neth J Med*. 2010; 68: 147–152.
- Ariga SK, Abatepaulo FB, Melo ESA, Velasco IR, Pinheiro da Silva F, Lima TM, Soriano FG. Endotoxin tolerance drives neutrophil to infectious site. *Shock*. 2014; 42(2): 168-173.
- Barlow PG, Svoboda P, Mackellar A, Nash AA, York IA, Pohl J, Davidson DJ, Donis RO. Antiviral Activity and Increased Host Defense against Influenza Infection Elicited by the Human Cathelicidin LL-37. *PLoS ONE*. 2011; 6(10): e25333.
- Berkestedt I, Herwald H, Ljunggren L, Nelson A, Bodelsson M. Elevated Plasma Levels of Antimicrobial Polypeptides in Patients with Severe Sepsis. *J Innate Immun*. 2010; 2:478–82.
- Biswas SK, Bist P, Dhillon MK, Kajiji T, Del Fresno C, Yamamoto M, Lopez-Collazo E, Akira S, Tergaonkar V. Role for MyD88-independent, TRIF pathway in lipid A/TLR4-induced endotoxin tolerance. *J Immunol*. 2007; 179(6):4083-92.
- Bjerknes M, Cheng H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. IV. Effects of resecting 30% of the small intestine. *Am J Anat*. 1981; 160:93–103.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992; 101:1644–1655
- Book M, Chen Q, Lehmann LE, Klaschik S, Weber S, Schewe J-C, Luepertz M, Hoeft A, Stuber F. Inducibility of the endogenous antibiotic peptide beta-defensin

2 is impaired in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2007; **11**:R19. doi:10.1186/cc5694.

Braff MH, Hawkins MA, Nardo AD, Lopez-Garcia B, Howell, Wong C, Lin K, Streib JE, Dorschner R, Leung DYM, Gallo RL. Structure-Function Relationships among Human Cathelicidin Peptides: Dissociation of Antimicrobial Properties from Host Immunostimulatory Activities. *J Immunol*. 2005; **174**: 4271–4278. doi:10.4049/jimmunol.174.7.4271.

Brown KL, Poon GF, Birkenhead D, Pena OM, Falsafi R, Dahlgren C, Karlsson A, Bylund J, Hancock RE, Johnson P. Host defense peptide LL-37 selectively reduces proinflammatory macrophage responses. *J Immunol*. 2011; **186**(9):5497-505.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal Models of Sepsis: Setting The Stage. *Nature Reviews*. 2005. **4**(10):854-865.

Calvano SE, Thompson WA, Marra MN, Coyle SM, de Riesthal HF, Trousdale RK, Barie PS, Scott RN, Moldawer LL, Lowry SF. Changes in polymorphonuclear leukocyte surface and plasma bactericidal/permeability-increasing protein and plasma lipopolysaccharide binding protein during endotoxemia or sepsis. *Arch Surg*. 1994; **129**: 220–226. doi:10.1001/

Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res*. 2005; **11**(5):311-20.

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

Chaudhry N, Duggal AK. Sepsis associated encephalopathy. *Adv Med*. 2014; **2014**:762320. doi:10.1155/2014/762320.

Chen X, Howe J, Andrä J, Rössle M, Richter W, Silva APG, Krensky AM, Clayberger C, Brandenburg K. “Biophysical analysis of the interaction of granulysin-derived peptides with enterobacterial endotoxins”. *Biophys Acta*. 2007; **1768** (10): 2421–2431. doi:10.1016/j.bbamem.2007.05.001.

Cole AM, Liao HI, Stuchlik O, Tilan J, Pohl J, Ganz T: Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. *J Immunol*. 2002; **169**(12):6985-6991. copbio.2008.10.006.

Davenport EE, Burnham KL, Radhakrishnan J, Humburg P, Hutton P, Mills TC1, Rautanen A, Gordon AC, Garrard C, Hill AV, Hinds CJ, Knight JC. Genomic

landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2016; 4(4):259-71. doi: 10.1016/S2213-2600(16)00046-1.

De Lima T, Sampaio SC, Petroni R, Brigatte P, Velasco IT, Soriano FG. Phagocytic activity of LPS tolerant macrophages. *Mol Immunol*. 2014; (60): 8-13. doi: 10.1016/j.molimm.2014.03.010.

Di Nardo, AMH, Braff KR, Taylor CNa, Granstein RD, McInturff JE, Krutzik S, Modlin R L, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *J.Immunol*. 2007. 178: 1829–1834.

Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*. 2002; 4(9):903-14.

Draisma A, Pickkers P, Bouw MPWJM, Van der Hoeven JG. Development of endotoxin tolerance in humans in vivo. *Crit. Care Med*. 2009. 37(4): 1261–1267

Duits LA, Ravensbern B, Rademaker M, Hiemstra PS. Expression of b-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. 2002; *Immunol*. 2002: 106 517–525.

Easton DM, Nijnik A, Mayer ML, Hancock REW. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. *Trends Biotechnol*. 2009; 27(10):582–90. doi:10.1016/j.tibtech.2009.07.004.

Eisenhauer PB, Leher R. Mouse Neutrophils Lack Defensins. *Infect Immun*. 1992; 3446-3447. doi 0019-9567/92/083446-02\$02.00/0.

Elssner A, Duncan M, Gavrilin M, Wewers MD. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J Immunol*. 2004; 172(8):4987-94.

Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res*. 2004; 10(2):71-84.

Fildes P, PRFJ. 1858–1945. Biogr Memoirs Fellows Royal Soc. 1956; 2: 237–247.

Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016; 193:259–272.

Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*. 2007; 447(7147):972-978.

Franck V, Alice B, Alexandre M: The new sepsis definition: limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis. *Curr Opin Anesthesiol*. 2017; 30(2):200-204. doi:10.1097/ACO.0000000000000446.

Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007; 4(8):444-54.

Froy O. Regulation of mammalian defensin expression by toll-like receptor-dependent and independent signaling pathways. *Cell Microbiol*. 2005. (7):1387–97. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00590.x.

Gallo RL, Kim KJ, Bernfield M, Kozak CA, Zanetti M, Merluzzi L, Gennaro R. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem*. 1997; 272:13088–13093.

Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med*. 2001; (29):21–27.

Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med*. 2001; (29):21–27.

Haiman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med*. 1994; 179(1):269-277.

Hamill P, Brown K, Jenssen H, Hancock RE. Novel anti-infectives: is host defence the answer? *Curr Opin Biotechnol*. 2008; 19(6):628-636.

Hancock RE, Falla T, Brown M: Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microb. Physiol* 37, 135-175, 1995.

Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006; 24(12):1551-7.

Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schroder JM. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 22(6):714-721.

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276(8):5707-5713.

Hiemstra PS, Amatngalim GD, van der Does AM, Taube C. Antimicrobial Peptides and Innate Lung Defenses: Role in Infectious and Noninfectious Lung Diseases and Therapeutic Applications. *Chest*. 2016; 149(2):545-551.

Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 862–874.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 48:138-50.

Jenssen H, Gutteberg TJ, Rekdal Ø, Lejon T. Prediction of activity, synthesis and biological testing of anti-HSV active peptides. *Chem Biol Drug Des*. 2006 Jul;68(1):58-66.

Jeremias IC, Victorino VJ, Machado JL, Barroso WA, Ariga SK, Lima TM, Soriano FG. The Severity of Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis Correlates with the Degree of Encephalopathy, but the Sepsis Does Not Lead to Acute Activation of Spleen Lymphocytes in Mice. *Mol Neurobiol*. 2016; 53(5):3389-3399. doi: 10.1007/s12035-015-9290-3.

Kaconis Y, Kowalski I, Howe J, Brauser A, Richter W, Razquin-Olazarán I, Iñigo-Pestaña M, Garidel P, Rössle M, Martinez de Tejada G, Gutschmann T, Brandenburg K. Biophys Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides. *Biophys J*. 2011; 8;100(11):2652-2661. doi: 10.1016/j.bpj.2011.04.041.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006; 13(5):816-25.

Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.

Kempker JA, Martin GS. The changing epidemiology and definitions of sepsis. *Clin Chest Med*. 2016; 37:165–179.

Kondo T, Takata H, Takiguchi M. Functional expression of chemokine receptor CCR6 on human effector memory CD8⁺T cells. *Intensive Care Med*. 2007. **37**:54–65. doi:10.1002/eji.200636251

Kourilsky P, Truffa-Bachi P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol*. 2001; 22(9):502-509.

Lai Y, Adhikarakunnathu S, Bhardwaj K, Ranjith-Kumar CT, Wen Y, Jordan JL, Wu LH, Dragnea B, San Mateo L, Kao CC. LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs. *PLoS One*. 2011; 6(10):e26632.

Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a Novel Antimicrobial Lipopolysaccharide-Binding Protein. *Infect. Immun.* 1995; 63 (4):1291–1297.

Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol.* 2001 Apr 15;166(8):5161-7.

Lehrer RI, Ganz T, Szklarek D, Selsted ME. Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *Journal of Clinical Investigation.* 1988; 81(6):1829-35.

Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol.* 1998 Feb;10(1):41-4.

Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11(1):23-7.

Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol.* 2002. (14): 96–102. doi:10.1016/S0952-7915(01)00303-X.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Care Med.* 2003; 29:530–538. doi. 10.1007/s00134-003-1662-x.

Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides.* 2012; 37(2):207-15.

Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. 1407–1410. In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood.* 1986; 68(6):1407-1410.

Linde-Zwirble, WT Angus, DC. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection and society. *Am J Crit Care.* 2004; (8):222-226.

Liu Y, Tong G, Tong W, Lu L, Qin X. Can body mass index, waist circumference, waist-hip ratio and waist-height ratio predict the presence of multiple metabolic risk factors in Chinese subjects. *BMC Public Health.* 2011; 11:35. <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/11/35>.

Liu AY, Destoumieux D, Wong AV, Park CH, Valore EV, Liu L, Ganz T: Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol.* 2002; 118(2): 275-281.

Mac Redmond R, Greene C, Taggart CC, McElvaney T, O'Neill S. Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of Human b-defensin 2 by Lipopolysaccharide. *Respir Res.* 2005; 6(1):116. doi: 10.1186/1465-9921-6-116.

Manjuck J, Saha DC, Astiz M, Eales LJ, Rackow EC. Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J Lab Clin Med.* 2000;135:153–60

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003; 348:1546-54.

Martin L, van Meegern, Doemming S, Schuerholz T. Antimicrobial peptides in human sepsis. *Front Immunol.* 2015; (6): 404. doi: 10.3389/fimmu.2015.00404.

Martin G. Epidemiology studies in critical care. *Crit Care.* 2006; 10(2):136 doi:10.1186/cc4897.

Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012; 10(6):701-716.

Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, Mc Cray PBJ. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun.* 1999; 67(6): 2740-2745.

Matsuzaki K1, Yoneyama S, Fujii N, Miyajima K, Yamada K, Kirino Y, Anzai K. Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide, tachyplesin I, and its linear analog. *Biochemistry.* 1997 Aug 12;36(32):9799-806.

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

Miles K, Clarke DJ, LU W, Sibinska Z, Beaumont PE, Davidson DJ, Barr TA, Campopiano DJ, Grat M. Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of α -defensins. *J Immunol.* 2009; August 1:183(3): 2122–2132. doi:10.4049/jimmunol.0804187.

Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohé J, Bienvenu J, Lepape A. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low

monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett.* 2004; 95: 193–198

Monneret, G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol.Med.* 2008; 14, 64–78.

Munoz C, Carlet J, Fitting, C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. *Eur. J. Immunol.* 1991. 21: 2177-2184.

Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocyte during sepsis. 1991. *J. Clin. Invest.* 88, 1747–1754.

Murphey C1, Chang S, Zhang X, Arulanandam B, Forsthuber TG. Induction of polyclonal CD8+ T cell activation and effector function by Pertussis toxin. *Cell Immunol.* 2011;267(1):50-5.

Murphy, CJ, Foster B.A., Mannis, MJ, Selsted ME, Reid TW. Defensins Are Mitogenic for Epithelial Cells and Fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1993; **155**: 408–413.

Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Heumann D.J Immunol. 2001 Sep 15;167(6):3329-38. Cathelicidin Family of antibacterial peptides CAP 18 and CAP11 inhibit the expression. Of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14 (+) cells. *J Immunol.* 2001; 167:3329-3338. doi: 10.4049/jimmunol.167.6.3329.

O'Neill AJ, Bowie AG: The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(5):353-64.

Olbrich P, Pavón A, Rosso ML, Molinos A, de Felipe B, Sanchez B, Praena-Fernández JM, Jimenez F, Obando I, Neth O. Association of Human Beta-Defensin-2 Serum Levels and Sepsis in Preterm Neonates. *Pediatric Crit Care.* 2013; 14(8):796-800. doi: 10.1097/PCC.0b013e3182975e0f.

Opal SM, Palardy JE, Marra MN, Fisher CJ, McKelligon BM, Scott RW. Relative concentrations of endotoxin-binding proteins in body fluids during infection. *Lancet.* 1994; (344):429–31. doi:10.1016/S0140-6736(94)91767-1.

Pachot A, Lepape A, Vey S, Bienvenu J, Mougin B, Monneret G. Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: A preliminary study. *A. Immunol Lett*; 2006; 106(1):63-71.

Pena OM, Hancock DG, Lyle NH, Linder A, Russell JA, Xia J, Fjell CD, Boyd JH, Hancock RE. An Endotoxin Tolerance Signature Predicts Sepsis and Organ Dysfunction at Initial Clinical Presentation. *EBioMedicine*. 2014 Nov 1;1(1):64-71.

Pérez, CC, Foncea, MAE. Shock séptico. *Anales de cuidados intensivos*. 2000; (7):1-50.

Perl M, Lomas-Neira J, Venet F, Chung CS, Ayala A. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert Rev Respir Med*. 2011; 5(1):115-26. doi: 10.1586/ers.10.92.

Pinheiro da Silva F, Gallo RL, Nizet V. Differing effects of exogenous or endogenous cathelicidin on macrophage toll-like receptor signaling. *Immunol Cell Biol*. 2009; 87(6): 496–500. doi:10.1038/icb.2009.19.

Pinheiro da Silva F, Medeiros MCR, Gomes dos Santos AB, Ferreira MA, Garippod AL, Chammas R, Caldin E, Velasco IT, Possolo de Souza H, Machado MCC. Neutrophils LL-37 migrate to the nucleus during overwhelming infection. *Tissue Cell*. 2013; 45: 318– 320.

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR-4 gene. *Science*. 1998; 282: 2085-2088.

Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59 (1): 156–170.

Pulido D, Nogués MV, Boix E, Torrent M. Lipopolysaccharide neutralization by antimicrobial peptides: a gambit in the innate host defense strategy. *J Innate Immun*. 2012; 4(4):327-36.

Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev. Biochem*. 2002 ; 71: 635–700. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*. 2007; 170:1435–1444.

Ren SH, Cheng ASL, To KF, Tong JHM, Li MS, Shen J, Wong CCM, Zhang Li, Chan RLY, Wang XJ. Host Immune Defense Peptide LL-37 Activates Caspase-Independent Apoptosis and Suppresses Colon Cancer. *Cancer Res*. 2012; (72) (24): 6512–6523. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2359.

Rintala E, Peuravuori H, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM, Nevalainen T. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in sepsis correlates with the

severity of sepsis and the outcome. *Intensive Care Med.* 2000; 26: 1248–51. doi:10.1007/s001340000616.

Romero CD, Varma TK, Hobbs JB, Reyes A, Driver B, Sherwood ER. The Toll-Like Receptor 4 Agonist Monophosphoryl Lipid A Augments Innate Host Resistance to Systemic Bacterial Infection. *Infect. Immun.* 2011; 3576–3587.

Ryan L, Diamond G. Mouse Beta-Defensin-1 Plays a Role in Influenza Innate Immunity. *J Immunol.* 2010; 184:37-49.

Saeed S, Quintin J, Kerstens H, Rao NA, Aghajani-Refah A, Matarese F, Cheng SC, Ratter J, Berentsen K, van der Ent A, Sharifi N, Janssen-Megens EM, Huurne MT, Mandoli A, Schaik TV, Ng A, Burden F, Downes K, Frontini M, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ouwehand WH, van der Meer JWM, Joosten LAB, Wijmenga C, Martens JHA, Xavier RJ, Logie C, Netea MG, Stunnenberg HG. Epigenetic programming during monocyte to macrophage differentiation and trained innate immunity. 2014; *Science.* 6; 345(6204): 1251086. doi:10.1126/science.1251086.

Salzer S1, Kresse S1, Hirai Y1, Koglin S1, Reinholz M1, Ruzicka T1, Schaubert J2. Cathelicidin peptide LL-37 increases UVB-triggered inflammasome activation: possible implications for rosacea. *J Dermatol Sci.* 2014 Dec;76(3):173-9.

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

Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock REW. The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Responses Immune Multifunctional Modulator of Innate. *J Immunol.* 2002; 169:3883-3891. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.38.

Scott A, Weldon S, Buchanan PJ, Schock B, Ernst RK, McAuley DF, Tunney MM, Irwin CR, Elborn JS, Taggart CC. Evaluation of the ability of LL-37 to neutralize LPS in vitro and ex vivo. *PLoS One.* 2011; 6(10):e26525. doi: 10.1371/journal.pone.0026525. Epub 2011 Oct 18.

Schaller-Bals S, Schulze A, Bals R. Increased level of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am J Respir Crit Care.* 2000; 165: 992–5. doi:10.1164/ajrccm.165.7.200110-020.

Schaller-Bals S, Schulze A, Bals R. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am J Respir Crit Care.* 2002;165:992–5.

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ.. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 1990; 249(4975):1429-31.

Severino P, Ariga SK, Barbeiro HV, de Lima TM, Silva EP, Barbeiro DF, Machado, MCCM, Nizet V, Pinheiro da Silva F. Cathelicidin-deficient mice exhibit increased survival and upregulation of key inflammatory response genes following cecal ligation and puncture. *JMo IMed*. 2017; (95): 995-1003. doi 10.1007/s00109-017-1555-z.

Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld, G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8):762–774. doi:10.1001/jama.2016.0288.

Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;5(8):775–787.

Shi J, DVM. Defensins and Paneth Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13: 1284–1292.

Shu Q, Shi Z, Zhao Z, Chen Z, Yao H, Chen Q,. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia and sepsis-induced lung injury by over- expression of beta-defensin-2 in rats. *Shock*. 2006; 26:365–371. doi:10.1097/01.shk.0000224722.65929.58.

Shukla P, Rao GM, Pandey G, Sharma, S Mittapelly N, Shegokar R, Mishra P. RR. Therapeutic interventions in sepsis: current and anticipated pharmacological agents. *Br. J. Pharmacol*. 2014; 171 (2014): 5011–5031.

Silva E, Fernandes Júnior CJ, Akamine M, Sogayar AMCB. Sepsis e choque séptico. In: Knobel E. Condutas no paciente grave. *Crit Care*. 2006. 61-78. doi:10.1186/cc4897.

Simmonds N, Furman M, Karanika E, Phillips A, Bates AWH. Paneth cell metaplasia in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. *BMC Gastroenterol*. 2014. 14:93. doi: 10.1186/1471-230X-14-93.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, Van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8):801–810.

Siqueira-Batista R, Gomes AP, Pessoa-Júnior VP. Sepsis, em: Rocha MOC, Pedrosa ERP. *Fundamentos em infectologia*. 2009; 567-590.

Siqueira-Batista R, EG de Mendonça, A P Gomes, RR Vitorino, Miyadahira R, Alvarez-Perez MC, MGA Oliveira: Atualidades proteômicas na sepsis. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2012; 58(3):376-382.

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

Staudt, LM: Gene expression physiology and pathophysiology of the immune system. *Trends Immunol*. 2001; 22(1): 35-40.

Stephens TA, Nikoobpour E, Ride BJ, Leon-Ponte M, Chau TA, Mikolajczak S, Chaturvedi P, Lee-Chan E, Flavell RA, Haeryfar MM, Madrenas J, Sing B. Dendritic cell differentiation induced by a self-peptide derived from apolipoprotein E. *J Immunol*. 2008; (181): 6859-6871. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6859.

Stetson, D. B, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immun*. 2006; 25: 373–381.

Suzuki K, Murakami T, Kuwahara-Arai K, Tamura H, Hiramatsu K Nagaoka I, Human anti-microbial cathelicidin peptide LL-37 suppresses the LPS-induced apoptosis of endothelial cells, *Int. Immunol*. 2011; 23 (3):185–193.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005; 17(1):1-14.

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004; 53:1–4.

Teclé T, Tripathi S, Hartshorn KL. Review: Defensins and cathelicidins in lung immunity. *Innate Immun*. 2010; 16(3):151-159. doi: .1177/1753425910365734.

Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest*. 1989; (84):2017–2020. doi:10.1172/JCI114394 .

Thomas NJ, Carcillo JA, Doughty LA, Sasser H, Heine RP. Plasma concentrations of defensins and lactoferrin in children with severe sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2002; **21**:34–8. doi:10.1097/00006454-200201000-00008.

Travis SM, Conway BA, Zabner J, Smith JJ, Anderson NN, Singh PK. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999; **20**; 5:872-9.

Triantafilou M, Brandenburg K, Gustmann T, Seydel U, Triantafilou K: Innate recognition of bacteria: engagement of multiple receptors. *Crit Rev Immuno*. 2002; **22**(4): 251-68.

Van der Does AM, Beekhuizen H, Ravensbergen B, Vos T, Ottenhoff THM, Dissel JTV, Drijfhout JW, Hiemstra PS, Nibbering PH. Proinflammatory Signature toward Macrophages with a Proinflammatory Signature. *J Immunol*. 2010; (185): 1442-1449. doi: 10.4049/jimmunol.1000376.

Van Wetering, S. Mannesse-Lazeroms, SPG, Van Sterkenburg MAJA, Daha MR, Dijkman, JH, Hiemstra PS. Molecular Biology of acute lung injury. *Am J Physiology*. 1997a=; **272**:L888–L896.

van Wetering, S Tjabringa, GS, Hiemstra PS. Interactions between neutrophil-derived antimicrobial peptides and airway epithelial cells. *J Leukoc Biol April*. 2005; **77**:444-450.

Vandenbroucke RE, Vanlaere I, Hauwermeiren FV, Wonterg EV, Libert C. Pro-inflammatory effects of matrix metalloproteinase 7 in acute inflammation. *Mucosal Immunol*. 2014; **7** (3): 579- 588. doi:10.1038/mi.2013.76.

Vincent JL: Update on sepsis: pathophysiology and treatment. *Acta Clin Belg*. 2000; **55**(2): 79-87.

Volrats O, Pilmane M, Petersons A. Postsplenectomy Sepsis in splenectomized, Partially Splenectomized and Non-splenectomized Rats after Streptococcus Pneumoniae Challenge. *Eur J Pediatr Surg*. 2011; **21**:65-69. doi: 10.1055/s-0029-1246197.

Wang G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins. *Pharmaceuticals*. 2014; (7): 545-594. doi:10.3390/ph7050545.

Wenzel RP. Treating sepsis. *N Engl J Med*. 2002; **347**(13):966-7.

Wolach B, Coates TD, Hugli TE, Baehner RL, Boxe LA. Plasma lactoferrin reflects granulocyte activation via complement in burn patients. *J Lab Clin Med*. 1984; 103: 284–93.

Wolk K, Döcke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*. 2000 Jul 1;96(1):218-23.

Xia X, Cheng L, Zhang S, Wang L, Hu J. The role of natural antimicrobial peptides during infection and chronic inflammation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017. doi: 10.1007/s10482-017-0929-0.

Xie GH, Chen QX, Cheng BL, Fang XM: Defensins and Sepsis. *Biomed Res Int*. 2014:180109, 2014.

Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:181-215.

Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2000. (68):9–14.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Schröder JM, Wang JM, Howard OMZ, Oppenheim JJ. Beta- defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999. (286):525–528. doi:10.1126/science.286.5439.525.

Zaio M, Gallo RL. Cathelicidins essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J Mol Med*. 2002; 80:549–61. doi:10.1007/s00109-002-0350-6.

Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptide of the innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2004; 75:39 –48. doi:10.1189/jlb.0403147 38.

Zhang H, Porro G, Orzech N, Mullen B, Li M, Slutsky AS. Neutrophil defensins mediate acute inflammatory response and lung dysfunction in dose-related fashion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; 280: L947–L954.

Zhang X, Oglecka K., Sandgren S, Belting M, Esbjörner EK, B Norde'n, Gräslund A. Dual functions of the human antimicrobial peptide LL-37: target membrane perturbation and host cell cargo delivery. *Biochim Biophys Acta*. 2010.1798:2201–2208.

Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Letters*. 1996; 396:319-322.