MARTA LUCIA DE ALMEIDA

**Investigação do microbioma intestinal em camundongos deficientes em
CRAMP submetidos à sepse experimental**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro da Silva

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Marta Lucia de
Investigação do microbioma intestinal em
camundongos deficientes em CRAMP submetidos à sepse
experimental / Marta Lucia de Almeida. -- São
Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de
Concentração: Processos Imunes e Infecciosos.
Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Descritores: 1.Sepse 2.Peptídeos catiônicos
antimicrobianos 3.Microbioma gastrointestinal
4.Escherichia coli 5.Bacteroides vulgatus
6.Camundongos

USP/FM/DBD-426/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Ao meu querido pai, com honra, amor e gratidão pelo ensino e orientação desde minha infância, incentivando-me a buscar o conhecimento e a sabedoria semelhantemente a um tesouro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão Marcelo e ao Dr. Emerson Martins, que me encaminharam ao mestrado, fazendo-me acreditar que conexões movem a vida.

Ao Prof. Dr. Fabiano Pinheiro, por conduzir com zelo as etapas desse estudo, orientando de maneira a permitir meu crescimento acadêmico e científico.

Ao Dr. Marcel Machado, por compartilhar sabedoria e conhecimento com os alunos felizardos em sua companhia.

À Kelli, Geraldo, Sueli, Dra. Denise, Dr. Hermes e colegas conquistados no LIM-51, que me ensinaram e me ajudaram em cada etapa desse trabalho.

Aos colegas alunos Mariana, Marcos, Ricardo, Rosângela, Neusa, Rafael, Beatriz, Mike e Vanessa, pela troca de conhecimentos durante as aulas, bancada de experimentos e conversas informais.

Às minhas amigas pessoais Adriana Palmeira, Claudia Santos, Jucilene Pontes, Julia Rosa e Priscila Graciano pelos incentivos nas adversidades.

Às minhas irmãs Maria Aparecida e Viviane, pelo amor incondicional em meus momentos de ausência e agenda lotada.

À Faculdade de Medicina da USP, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Ao Deus da minha vida, que me sustentou, alegrou e motivou nessa jornada.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Microbioma humano	2
1.1.1	Microbioma intestinal nas fases da vida	3
1.1.2	Microbioma intestinal humano versus camundongo	4
1.2	Intestino humano saudável	4
1.3	O papel da microbiota sobre a barreira intestinal	5
1.3.1	A influência da microbiota na ecologia intestinal	7
1.3.2	Microbiota intestinal e sistema imunológico	8
1.3.3	Microbiota intestinal e disfunção epitelial	9
1.4	Peptídeos antimicrobianos	10
1.4.1	Atividade antimicrobiana e hemolítica dos AMPs	11
1.4.2	Atividade antiviral da LL-37	11
1.4.3	Atividade pró e anti-inflamatória da LL-37	12
1.4.4	Microbiota intestinal e LL-37	13
1.4.5	Atividade da LL-37 em mucosas	13
1.5	Sepse: uma doença crítica	13
1.5.1	Sepse e sistema imunológico	15
1.5.2	Sepse e microbioma intestinal	15
1.5.2.1	Sepse e transplante fecal	16
1.5.3	Tríade: seps, microbiota e sistema imunológico	17
2	OBJETIVO GERAL	19
2.1	Objetivos Específicos	19
3	MÉTODOS	20
3.1	Local de experimentação	20
3.2	Animais	20
3.2.1	Camundongos em gaiola metabólica	21

3.2.2	Camundongos em gaiola convencional	21
3.3	Coletas de amostras fecais	22
3.4	Coletas de sangue e órgãos específicos	22
3.4.1	Separação de plasma e de hemácias	23
3.4.2	Pulverização de órgãos coletados	23
3.5	Técnicas aplicadas	24
3.5.1	Modelo animal em sepse: ligadura e punção cecal (CLP).....	24
3.5.2	Extração de DNA em amostras fecais	24
3.5.3	Quantificação de DNA e RNA por espectrofotometria	26
3.5.4	Eletroforese em gel de agarose a 2%	26
3.5.5	Eletroforese em gel de agarose a 1,5%	27
3.5.6	Investigação de bactérias em amostras fecais em qPCR	27
3.5.6.1	Investigação de bactérias com <i>kit</i> para PCR <i>array</i> de DNA microbiano	28
3.5.6.2	Investigação de bactérias com <i>primers</i> específicos	29
3.5.7	Purificação de RNA em órgãos coletados	30
3.5.8	Investigação de defensinas em PCR	31
3.5.9	Purificação de proteínas	32
3.5.10	Quantificação de proteínas totais	33
3.5.11	Quantificação de citocinas em imunoensaio	33
3.5.12	Deteção e quantificação de defensinas por imunoensaio	35
3.5.12.1	Imunoensaio para α -defensina 7	35
3.5.12.2	Imunoensaio para β -defensina 1	36
3.6	Análise de dados e métodos estatísticos	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Quantificação de bactérias em amostras fecais	38
4.1.1	Bactérias pesquisadas em <i>kit</i> para PCR <i>array</i> de DNA	38
4.1.1.1	Espécies identificadas através do <i>kit</i> da Qiagen	39
4.1.2	Bactérias específicas	41
4.1.2.1	Quantificação de bactérias utilizando <i>primers</i> específicos	41
4.2	Identificação de peptídeos antimicrobianos em tecidos	44
4.2.1	Análise estatística da expressão de α -defensina 5 e β -defensina 1 ..	45
4.3	Análise de dados de defensinas e citocinas	47

4.3.1	Análise estatística de liberação de defensinas α -7 e β -1.....	48
4.3.2	Análise estatística da liberação de citocinas	50
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÃO.....	61
	ANEXO	62
	REFERÊNCIAS	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Peptídeo antimicrobiano
ANOVA	Análise de variância
CD	Célula dendrítica
CG	Centro germinativo
CLP	Ligadura e punção cecal
CAMP	Peptídeo antimicrobiano catiônico
CRAMP	Peptídeo antimicrobiano ligado à catelina
CT ou C _T	<i>Threshold cycle</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
HIF-1 α	Fator indutível por hipóxia-1 α
HRV1B	Rinovírus humano 1B
IEC	Célula epitelial intestinal
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
KO	<i>Knock-out</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LOS	Sepse neonatal tardia
LPS	Lipolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos -1
miBC	Coleção Bacteriana Intestinal de Camundongo
MOD	Disfunção de múltiplos órgãos

PACAP	Polipeptídeo ativador de adenilato ciclase da pituitária
PAD	Peptidil-arginina deaminase
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCT	Procalcitonina
PMSF	Fluoreto de fenilmetano sulfonila ou fluoreto de fenilmetilsulfonila
PP	Placa de Peyer
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RT-qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real
SABC	Conjugado HRP-streptavidina
SFB	Bactéria filamentosa segmentada
TBE	Trisborato ETDA
TGI	Trato gastrointestinal
TJ	Junção apertada
TLR	Receptor tipo <i>toll</i>
TMF	Transplante de microbiota fecal
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de terapia intensiva
WT	<i>Wild type</i>

RESUMO

Almeida ML. *Investigação do microbioma intestinal em camundongos deficientes em CRAMP submetidos à sepse experimental* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O microbioma intestinal tem sido associado à sepse, causada por infecção, apresentando respostas imunológicas exacerbadas. O peptídeo antimicrobiano CRAMP atua na imunidade inata com característica ambígua, ora pró-inflamatória ora anti-inflamatória. Nesse estudo, a sepse foi induzida por modelo de ligadura e punção cecal (CLP) e, através de RT-qPCR, o DNA de amostras fecais de camundongos selvagens e deficientes em CRAMP foi analisado. A expressão de α -defensina 5 e β -defensina 1 foi investigada em RT-qPCR. Técnicas de imunofluorescência, Elisa e Milliplex, foram utilizadas na quantificação de citocinas – IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α –, e α -defensina 7 e β -defensina 1. Os resultados mostraram a intensificação da resposta imune, diante da sepse, com alterações pró-inflamatórias de IL-1 β , IL-6, MCP-1 e TNF- α e anti-inflamatória de IL-10. A β -defensina 1 teve expressão aumentada, enquanto a produção foi mantida ou reduzida nos tecidos, após CLP. A liberação de α -defensina 7 foi ampliada no pulmão de animais selvagens durante a sepse, enquanto a expressão de α -defensina 5 foi reduzida no íleo e cólon. A relação entre o microbioma intestinal e a sepse evidenciou-se com o crescimento da espécie *Escherichia coli*, enquanto o CRAMP apresentou associação com a espécie *Bacteroides vulgatus*. Novos estudos permitiram mais conhecimento sobre a interação entre sepse e microbioma intestinal, potencializando o uso de biomarcadores e nova terapêutica na recuperação intestinal, tal como transplante microbiológico fecal.

Descritores: sepse; peptídeos catiônicos antimicrobianos; microbioma gastrointestinal; *Escherichia coli*; *Bacteroides vulgatus*; camundongos.

ABSTRACT

Almeida ML. *Investigation of the intestinal microbiome in mice deficient in CRAMP subjected to experimental sepsis* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

The intestinal microbiome has been associated with sepsis, caused by infection, presenting exacerbated immune responses. The antimicrobial peptide CRAMP acts on innate immunity with ambiguous features, pro-inflammatory and anti-inflammatory. In this study, sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) model and, through RT-qPCR, the DNA of fecal samples from wild type and CRAMP-deficient mice was analyzed. Expression of α -defensin 5 and β -defensin 1 was investigated in RT-qPCR. Immunofluorescence techniques, Elisa and Milliplex, were used to quantify cytokines – IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 and TNF- α –, and α -defensin 7 and β -defensin 1. The results showed the enhancement of the immune response to sepsis with proinflammatory alterations of IL-1 β , IL-6, MCP-1 and TNF- α and anti-inflammatory IL-10. CRAMP and β -defensin 1 peptides had increased expression, while production was maintained or reduced in tissues after CLP. The release of α -defensin 7 was amplified in the lungs of wild type animals during sepsis, while expression of α -defensin 5 was reduced in the ileum and colon. The relationship between the intestinal microbiome and sepsis was evidenced by the growth of *Escherichia coli*, while CRAMP was associated with *Bacteroides vulgatus*. New studies have allowed more knowledge about the interaction between sepsis and intestinal microbiome, potentializing the use of biomarkers and new therapy in intestinal recovery, such as fecal microbiological transplantation.

Descriptors: sepsis; antimicrobial cationic peptides; gastrointestinal microbiome; *Escherichia coli*; *Bacteroides vulgatus*; mice.

1 INTRODUÇÃO

O advento dos antibióticos e a expansão da indústria farmacêutica, durante a Segunda Guerra Mundial, trouxeram possibilidade de maior sobrevivência aos feridos em combate.⁽¹⁾ Contudo, a guerra contra infecções bacterianas, de maneira irracional, acarretou outras preocupações, como resistência a antibióticos e doenças modernas – creditadas aos microrganismos –, tais como doenças autoimunes, inflamatórias e metabólicas. A comunidade científica busca respostas para o atual cenário de doenças registradas em décadas recentes.^(1, 2)

O ecossistema microbiano intestinal tem coevoluído com a espécie humana. Os milhões de genes microbianos, encontrados no trato gastrointestinal, respiratório, geniturinário e pele, formam um ‘extenso genoma’ denominado microbioma.⁽³⁻⁵⁾ O sucesso da relação entre a microbiota intestinal e o hospedeiro depende fundamentalmente da preservação da barreira intestinal, assegurando a saúde e sobrevivência do hospedeiro.^(4, 5)

A defesa imunológica inata conta com moléculas proteicas preservadas evolutivamente, os conhecidos peptídeos antimicrobianos, cujos principais representantes são catelicidinas – CRAMP em camundongos e LL-37 em humanos –, e defensinas.⁽⁶⁾ Perante a resistência bacteriana a antibióticos, os peptídeos antimicrobianos passaram a alvo de estudos como alternativa terapêutica.⁽⁷⁾

Eventos traumáticos, cirurgias, imunossupressão ou parto pré-termo podem levar pacientes a sepse, síndrome que envolve respostas exacerbadas do sistema imunológico, com tempestades de citocinas, decorrentes de infecção.⁽⁸⁻¹¹⁾

O presente estudo buscou responder a hipótese de que há associação entre a sepse e o microbioma intestinal, em meio à disbiose, identificando possíveis espécies oportunistas em detrimento a outras. Encontrar biomarcadores ou terapia alternativa, a exemplo de transplante de microbiota fecal, diante da amplitude global da sepse, é de suma importância.

1.1 Microbioma humano

Com o avanço de tecnologias, o mapeamento genético tornou-se possível e, em 2003, pesquisadores do Projeto Genoma Humano divulgaram os quase 20 mil genes humanos sequenciados. Porém as expectativas de diagnóstico, prevenção e tratamento de todas as doenças não foram atingidas e a decepção dos expectadores foi inevitável.⁽¹²⁾

Contudo, a proposta de um projeto, ainda mais ousado, potencializou o mapeamento do DNA de microrganismos residentes em dezoito *habitats* em cinco áreas diferentes no corpo humano. Esse trabalho recebeu o nome de Projeto Microbioma Humano.⁽¹²⁻¹⁴⁾

Os esforços na identificação da ecologia de microrganismos, especialmente no intestino, em pessoas saudáveis, vêm crescendo desde os anos 60. Teve início com a técnica cultura-dependente, que mostrou ser possível avaliar somente bactérias com bom desenvolvimento em laboratório. Na década de 70, trezentas espécies de bactérias intestinais foram identificadas por técnicas rigorosamente anaeróbicas, com ganho da quantificação por diluições seriadas.⁽¹³⁾

Técnicas independentes de cultura possibilitaram a investigação de DNA em amostras fecais humanas.⁽¹³⁾ A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) revelou seis grupos entre gêneros e espécies componentes de dois terços da microbiota intestinal, em estudo realizado na Europa Ocidental. Os grupos de bactérias pesquisadas em amostras fecais de humanos saudáveis foram *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides distasonis*, *Clostridium lituseburense*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium coccooides* e *Eubacterium rectale*.⁽¹⁵⁾

Estudos iniciais com sequenciamento do gene 16S RNA ribossômico (rRNA) atribuíram aos grupos *Bacteroides* e *Clostridium coccooides* e ao subgrupo *Clostridium leptum* um relevante percentual na abundância bacteriana fecal.^(16, 17) Utilizando-se da mesma técnica, pesquisadores analisaram a diversidade bacteriana em diferentes lócus colônico em indivíduos saudáveis e observaram a ausência de homogeneidade ao longo do cólon. Os filos Firmicutes e Bacteroidetes mostraram-se prevalentes, em detrimento à

pequena diversidade de Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia.⁽¹⁸⁾

Outros filos de bactérias, arqueas e eucariotos com menor diversidade também foram identificados, ou seja, no trato gastrointestinal humano existem representantes dos três domínios: Bacteria, Archaea e Eukarya.⁽¹⁹⁾

Com a utilização de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, o entendimento sobre “microbioma saudável” ampliou-se na última década.^{(13),(19)} Os perfis metagenômico e metaproteômico do microbioma intestinal de uma coorte populacional humana saudável foram avaliados. Os filos Firmicutes e Bacteroidetes mostraram uma ampla variabilidade interpessoal. Elevada e contínua atividade butirogênica observada impactou positivamente na homeostase intestinal.⁽²⁰⁾

1.1.1 Microbiota intestinal nas fases da vida

O amplo conhecimento da microbiota intestinal nos diversos momentos da vida potencializa a melhoria na qualidade de vida mediante a modulação da diversidade bacteriana.^(21, 22)

Estudos apontam para início da colonização bacteriana intestinal em recém-nascidos a partir da amamentação.^(23, 24) Sugere-se uma possível ligação entre a microbiota intestinal materna e a microbiota do leite, devido à presença de bactérias anaeróbicas residentes no intestino humano adulto.⁽²³⁾

A diversidade bacteriana em adultos saudáveis mostrou-se distinta em porções do cólon e nas fezes. Bactérias estritamente anaeróbicas foram encontradas na mucosa distal, como Porphyromonas, Anaerococcus, Finegoldia e Peptoniphilus, enquanto anaeróbicas facultativas foram identificadas na mucosa proximal, como Actinomyces, Enterobacteraceae, e aeróbica Pseudomonas. A microbiota fecal assemelhou-se a microbiota do lúmen distal.⁽²⁵⁾

Indivíduos idosos possuem microbiota intestinal distinta de pessoas mais jovens. Estudo apontou Bacteroidetes como filo dominante em amostras fecais de idosos acima de 65 anos, em contraste, com o filo Firmicutes prevalente em jovens adultos. Uma população específica de Clostridium cluster IV mostrou-se

aumentada em idosos, especialmente, a família Ruminococcaceae, representadas pelos gêneros Faecalibacterium, Sporobacter e Ruminococcus.⁽²⁶⁾

1.1.2 Microbiota intestinal humano versus camundongos

Devido à ampla utilização de camundongos em modelos experimentais e a sabida interação entre microrganismos e seus hospedeiros, tornou-se fundamental a identificação do microbioma intestinal desses animais.^(27, 28) O filo Firmicutes possui maior diversidade intestinal em camundongos, com 74% das cepas identificadas em estudo. Os filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria e Verrucomicrobia fazem parte dos 26% restantes.⁽²⁸⁾

A Coleção Bacteriana Intestinal de Camundongo (miBC) é composta por 76 espécies de bactérias intestinais. Ensaio mostraram que 32 espécies da miBC são compartilhadas entre humanos e camundongos, 16 espécies são distintas em camundongos e 28 espécies são raras ou pouco prevalentes. As espécies *Muribaculum intestinale*, *Bacteroides acidifaciens*, *Clostridium bifermentans*, *Flintibacter butyricus*, *Clostridium cocleatum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus reuterii*, *Turicimonas muris* são abundantes e prevalentes entre as 16 espécies características de camundongos.⁽²⁸⁾ Sugere-se a existência de importantes diferenças quantitativas e qualitativas entre o microbioma intestinal humano e de camundongos.^(27, 28)

1.2 Intestino humano saudável

O epitélio intestinal possui área superficial com mais de 200 m²,⁽²⁹⁾ sendo formado por uma única camada de células, cujo tempo de vida estimado varia entre cinco e sete dias. A diferenciação e renovação celular tem início em células multipotentes próximas à base da cripta e as novas células migram em direção ao ápice da vilosidade, com exceção das células de Paneth, cuja rota é descendente rumo à base da cripta. As principais células intestinais são os enterócitos, caliciformes, enteroendócrinas e células de Paneth. As funções de

absorção nutricional, proteção contra patógenos invasores, restrição na passagem de substâncias e secreção hormonal são importantes atribuições dessa camada.⁽³⁰⁻³²⁾

O intestino é considerado o maior compartimento do sistema imunológico do corpo humano, composto por quatro agrupamentos de células: placas de Peyer, lâmina própria, linfonodos mesentéricos e linfócitos intra-epiteliais.^(29, 31)

Células de Paneth surgem e tornam-se imunecompetentes durante a gestação, responsável pela proteção de células-tronco contra a ação de patógenos, através da produção de defensinas.⁽³³⁾

Células mesenquimais induzem a diferenciação de células M, as quais se ligam as células epiteliais, potencializando a produção de imunoglobulina A (IgA) através de células subepiteliais MCi. IgA está envolvida no equilíbrio intestinal e defesa contra patógenos.⁽³⁴⁾

Cerca de 100 trilhões de micróbios compõem o vasto microbioma humano que, em estado saudável, contribui para manutenção da barreira microbiológica e fisiológica.^(29, 35) A microbiota intestinal pode influenciar aspectos biológicos do hospedeiro, como metabolismo, fisiologia e imunidade.⁽³⁶⁾

Entre os vários fatores que influenciam a composição do microbioma intestinal destaca-se a genética do hospedeiro. Comparações entre estirpes de roedores e humanos revelaram uma maior semelhança quantitativa na abundância relativa entre os microbiomas dos roedores. Contudo, entre roedores e humanos foram encontradas relevantes diferenças na abundância bacteriana.⁽²⁷⁾

Condições ambientais, como dieta alimentar, idade e exposição precoce aos microrganismos, também tem sido apontadas como determinantes para a composição do microbioma.^(37, 38) Sugere-se que a colonização primária prediga a ecologia microbiana e a imunidade tardias.⁽²⁷⁾

1.3 O papel da microbiota sobre a barreira intestinal

A disbiose intestinal pode causar danos à saúde do hospedeiro. Os sistemas imunes inato e adaptativo atuam com estratégias altamente reguladas para proteção contra possíveis invasões e fatores de virulência.^{(39),(40)}

Ainda no útero materno, as placas de Peyer e os linfonodos mesentéricos são formados por codificação genética. A evolução do sistema imune acontece após o nascimento com intensa participação dos microrganismos, os quais induzem o desenvolvimento de folículos linfoides isolados e dos mecanismos inatos, bem como o estímulo das células *naïve* B e T, células efectoras T e a produção de imunoglobulina A (IgA).⁽³⁹⁾

A preservação de centros germinativos (CGs) em placa de Peyer (PP), mediada pela microbiota intestinal, favorece a atuação de IgA sobre antígenos.⁽⁴¹⁾ A ligação do peptídeo LL-37 ao receptor-2 peptídeo formil (Fpr2) em células dendríticas (CDs) auxilia a homeostase da mucosa. A redução de LL-37 representa a baixa na produção de IgA, devido a diminuição da ativação de CDs. Portanto, parceria entre LL-37 e CDs parece auxiliar na manutenção de CGs PP.⁽⁴²⁾

A mucosa intestinal apresenta relevante função de defesa antimicrobiana e na homeostase entérica. Facilita a absorção de nutrientes no intestino delgado, bem como impede a passagem de macromoléculas, bactérias residentes e patogênicas advindas do lúmen intestinal. O cólon possui uma camada de muco interna densa e aderente às células epiteliais, livre de bactérias, e uma camada externa mais fluida, cujas bactérias comensais são beneficiadas por seus nutrientes.^(43, 44) O intestino delgado possui apenas uma camada de muco, sendo mais concentrada nas criptas e deixando os ápices das vilosidades expostos ao lúmen. Estudos com murinos mostraram ter uma área de exclusão livre de bactérias sobre o epitélio no intestino delgado.⁽⁴³⁾

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) estão presentes na camada de muco e atuam na defesa contra agentes patogênicos e comensais. As células de Paneth, localizadas na base da cripta do intestino delgado, são suas principais produtoras (Figura 1).⁽⁴³⁾ Além de apresentarem atividades bactericidas, eles atuam no controle de alguns parasitas, fungos e vírus. Em mamíferos, existem duas importantes famílias de AMPs: as defensinas e as catelicidinas.⁽⁴⁴⁾

As principais defensinas são α -defensina e β -defensina, sendo expressas constitutivamente, como α -defensina 5 e β -defensina 1, ou ainda, por estímulos

inflamatórios.⁽⁴⁵⁾ As defensinas possuem propriedades quimiotáticas sobre células do sistema imunológico.⁽⁴⁶⁾

A catelicidina LL-37 é a única identificada em seres humanos. Atua amplamente contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e *Candida albicans*. Sendo expressa por várias células epiteliais, macrófagos, neutrófilos entre outros.^(44, 47, 48) Em roedores, a catelicidina conhecida é o peptídeo antimicrobiano relacionado à catelina (CRAMP).⁽⁴⁷⁾

As catelicidinas apresentam funções ambíguas, pró-inflamatória e anti-inflamatória, orquestradas por interações celulares, relação com microrganismos e variável impacto das doenças.⁽⁴⁷⁾

FONTE: adaptado Abbas AK et al, 2015.⁽²⁹⁾

Figura 1 – Esquema representativo de alguns elementos do intestino delgado

1.3.1 A influência da microbiota na ecologia intestinal

Ambos, hospedeiro e microrganismos, são mutuamente beneficiados pelo equilíbrio intestinal. A saúde do hospedeiro pode sofrer risco negativo por

desarranjos nessa ecologia.^(30, 40) A ausência ou a presença de cepas específicas na microbiota intestinal pode impactar a terapêutica de doenças.⁽⁴⁹⁾ Há evidências de cooperação entre os microrganismos simbiotes intestinais, como *Bacteroides ovatus* que digere polissacarídeo para beneficiar outras espécies.⁽⁵⁰⁾

A presença de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-3689 influenciou a recomposição da microbiota fecal em camundongos tratados com clindamicina. A suplementação de lactobacilos levou ao aumento do filo Bacteroidetes, relacionando-se à redução de Enterococcus resistentes à vancomicina. Os lactobacilos induziram o aumento de expressão do gene CAMP. Portanto, *L. paracasei* CNCM I-3689 contribuiu indiretamente com o equilíbrio intestinal, através de Bacteroidetes e resposta imune.⁽⁵¹⁾

A pneumonia (melioidose), causada por bactéria Gram-negativa *Burkholderia pseudomallei*, quando exacerbada, pode levar à sepse. Em modelo experimental de melioidose, a composição da microbiota fecal de camundongos teve profundas alterações, com aumento significativo de Proteobacteria e diminuição de Actinobacteria. O aumento da carga bacteriana no pulmão e fígado foi associado à disbiose intestinal após tratamento com antibióticos, ressaltando a importância da microbiota intestinal na defesa do hospedeiro.⁽⁵²⁾

1.3.2 Microbiota intestinal e sistema imunológico

A composição da microbiota intestinal é essencial já nas primeiras semanas de vida, pois influencia o desenvolvimento local das mucosas e na formação das estruturas linfoides secundárias no baço.⁽²⁴⁾ Manter a microbiota equilibrada durante a infância, com uso racional de antibióticos, favorece o desenvolvimento adequado da resposta de IgG e da memória imunológica no monitoramento de bactérias simbióticas.⁽⁵³⁾

Pesquisadores observaram que o sistema imunológico de camundongos machos e fêmeas apresentam algumas diferenças. O aumento da via de IFN tipo I no intestino de fêmeas parece influenciar a seleção da composição da microbiota específica do gênero. A presença de bactérias pró-inflamatórias no

intestino de machos apontou para menor resposta imune inata. A microbiota de machos influenciou no reparo do DNA e na ativação de vias do ciclo celular.⁽⁵⁴⁾

O gênero *Bifidobacterium* mostrou potencial atividade imunomoduladora em modelo animal de câncer, estimulando a resposta de células T tumoral-específicas.⁽⁵⁵⁾ Acredita-se que seja possível a interação entre sistema imune e o microbioma em doenças críticas e sistêmicas.^(49, 56)

Estudo revelou aumento da diversidade de transcritos microbianos presente no sangue total em indivíduos com esquizofrenia quando comparada a grupos saudável, transtorno bipolar e esclerose lateral amiotrófica. A análise de transcritos não abrange a etiologia do RNA microbiano, no entanto, cogitou-se a proximidade dos filos detectados com o microbioma intestinal e oral. Existiu intensa correlação inversa entre a diversidade microbiana e a abundância de células T em grupo controle saudável. Sugeriu-se a relação entre microbiota, imunidade e esquizofrenia.⁽⁵⁷⁾

Interessantemente, um núcleo mínimo comum de fatores imunológicos foi identificado em leite materno em diferentes locais geográficos. A maior plasticidade do sistema imune em amostras derivadas de países em desenvolvimento aponta para maior contato materno com microrganismos e outros antígenos.⁽⁵⁸⁾ O leite materno apresenta propriedades anti-inflamatórias e reduz o risco de sepse e enterocolite necrosante.⁽⁵⁹⁾

1.3.3 Microbiota intestinal e disfunção epitelial

Pesquisa realizada com pacientes acometidas pela síndrome do intestino irritável demonstrou maior permeabilidade epitelial do cólon e consequente translocação de bactérias vivas. A regulação positiva de vias de sinalização sugere a participação de peptídeos vasoativos intestinais e de mastócitos na disfunção da barreira intestinal.⁽⁶⁰⁾

Lipolissacarídeos (LPS) causaram o aumento da permeabilidade em monocamadas de células Caco-2 e na mucosa intestinal de camundongos. A permeabilidade elevada induzida por LPS mostrou-se dependente do aumento de expressão do receptor tipo *tolk* 4 (TLR-4) na membrana de enterócitos. Os

ensaios foram realizados com doses clinicamente relevantes de 0 a 1 ng/mL de LPS, porém sem perda de integridade da mucosa intestinal.⁽⁶¹⁾

A exposição de células de carcinoma intestinal humano, Caco-2, à *Lactobacillus rhamnosus* GG elevou a produção de mucina, aliviando os efeitos negativos pela presença de *Escherichia coli*. A preservação da barreira intestinal e a prevenção de translocação bacteriana foram observadas no mesmo estudo.⁽⁶²⁾

A ruptura da camada epitelial, com hiperpermeabilidade intestinal, permite a translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos. Em traumas por queimaduras, após a disseminação da inflamação por órgãos secundários, há uma vasoconstrição mesentérica, reduzindo a oxigenação no intestino. A morte celular é precipitada pela reperfusão sanguínea e agravamento da hipóxia. A migração das bactérias pode ser uma possível causa de sepse.⁽³⁵⁾

1.4 Peptídeos antimicrobianos

Vários pesquisadores concentram esforços em busca de novas terapêuticas antimicrobianas. A descoberta de novos peptídeos antimicrobianos (AMPs) ou ainda testes com moléculas sintetizadas contribuem para a expectativa de resultados positivos. O potencial antimicrobiano de um novo AMP descoberto na estrela-do-mar *Patiria pectinifera* e de quatro AMPs sintéticos foi demonstrado em estudo.⁽⁶³⁾

Em queijo Minas Canastra artesanal foi encontrada atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC25922, sendo identificados seis peptídeos antimicrobianos derivados de α_{s1} e β -caseína.⁽⁶⁴⁾

O impacto de alguns AMPs sobre células tumorais vem sendo estudado. O peptídeo VLL-28, com amplo poder antimicrobiano, encontrado em *Sulfolobus islandicus* (reino Archaea), demonstrou ação antitumoral seletiva induzindo apoptose em células malignas humanas e murinas.⁽⁶⁵⁾

A profilaxia com catelicidina (C-BF) purificada do veneno da serpente *Bungarus fasciatus* em modelo de endotoxemia em camundongos mostrou-se efetiva na preservação da barreira intestinal. C-BF preveniu a ruptura das

junções apertadas (TJ) e apoptose das células epiteliais, assim como inibiu a permeabilidade intestinal.⁽⁶⁶⁾

O polipeptídeo ativador de adenilato ciclase da pituitária (PACAP) mostrou ter ampla atividade contra bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*. PACAP38 e seus análogos apresentam baixa toxicidade aos eritrócitos humanos.⁽⁶⁷⁾

As expectativas de terapêuticas alternativas ao uso de antibióticos trazem consigo a precaução com a resistência bacteriana aos AMPs. Cepas de *Staphylococcus aureus* mostraram-se tolerantes a peptídeos antimicrobianos humanos.⁽⁶⁸⁾

1.4.1 Atividade antimicrobiana e hemolítica dos AMPs

Características físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) impactam na atividade hemolítica e no potencial antimicrobiano. A estrutura α -hélice altamente anfipática e, em alguns momentos, hidrofóbica, aumenta a afinidade do AMP pela membrana zwitterônica eritrocitária, motivando o aumento da hemólise.⁽⁶⁹⁾ CAMPs são atraídos por lipídios de cargas negativas da membrana eritrocitária, ligando-se a ela, resultando em desintegração. Atividades hemolíticas e antimicrobianas são dependentes da afinidade do AMP pelas cargas dos lipídeos.⁽⁷⁰⁾

Um modelo de surfactante pulmonar mostrou ser possível evitar a interação eletrostática do LL-37 e outros dois peptídeos com a cabeça polar dos lipídeos, mediante a adição de colato de sódio, mantendo a atividade antimicrobiana. Essa descoberta potencializa o uso de peptídeos antimicrobianos no tratamento de pneumonia.⁽⁷¹⁾

1.4.2 Atividade antiviral da LL-37

A forma ativa LL-37 da catelicidina humana possui atividade antiviral evidenciada contra diversos vírus. No combate ao rinovírus humano 1B (HRV1B), o LL-37 reduz o metabolismo das células infectadas e a replicação

viral, assegurando a integridade celular e descrendo consideravelmente a possibilidade de morte celular por apoptose ou necrose.⁽⁷²⁾

A vacina contra pólio vírus induziu a liberação aumentada de LL-37 nas fezes de neonatos vacinados nas primeiras 48 horas após o nascimento.⁽⁷³⁾

1.4.3 Atividade pró e anti-inflamatória da LL-37

Os mastócitos são essenciais para resposta inflamatória. A LL-37 possui efeito quimiotático sobre esses granulócitos, os quais são atraídos para o local da inflamação. Além disso, a atividade pró-inflamatória da LL-37 ainda pode ser evidenciada ao induzir os mastócitos à liberação de mediadores, como as citocinas.⁽⁷⁴⁾

LL-37 mostrou-se capaz de regular a resposta de neutrófilos a padrões antimicrobianos, induzindo a fagocitose *in vitro*.⁽⁴⁸⁾ Pode migrar ao núcleo de neutrófilos de indivíduos saudáveis e sépticos, infectados por *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*, *in vitro*. A ligação de LL-37 com vários receptores de membrana e intracelulares proporciona a indução de sinais celulares.⁽⁷⁵⁾

Observou-se o aumento dos níveis séricos de LL-37 em pacientes idosos acometidos com transtorno depressivo maior, configurando a relação entre inflamação e depressão.⁽⁷⁶⁾

A ativação da via mTOR parece ser essencial para a atividade do LL-37 contra inflamação induzida por LPS. O aumento de LL-37 pode inibir a secreção de citocinas inflamatórias, sugerindo sua atividade anti-inflamatória. Entretanto, a elevada expressão de LL-37 foi relacionada à inflamação crônica da pele. A sua atividade anti-inflamatória está relacionada à capacidade de promover a biogênese e o equilíbrio mitocondriais.⁽⁷⁷⁾

Estudo com crianças diagnosticadas com rinite alérgica mostrou a redução de LL-37 em fluído nasal em relação ao grupo controle, bem como sua redução nos pacientes com rinite moderada a grave em comparação à moderada.⁽⁷⁸⁾

1.4.4 Microbiota intestinal e LL-37

Há evidências que a LL-37 participe do equilíbrio intestinal, favorecendo a maior diversidade da microbiota, com ação direcionada a alguns táxons, especialmente a espécie *Adlercreutzia equolifaciens*, assim reduzindo o potencial surgimento de diabetes tipo 1.⁽⁷⁹⁾

A resistência à colonização por *Candida albicans* em camundongos adultos depende essencialmente do equilíbrio da microbiota intestinal. *Bacteroides thetaiotamicron* influenciou a ativação do fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α) e LL-37 (CRAMP em camundongos), conferindo proteção contra infecção por *Candida albicans*.⁽⁸⁰⁾

1.4.5 Atividade da LL-37 em mucosas

LL-37 pode estar envolvida na preservação e restauração da integridade da barreira intestinal, promovendo a sua cicatrização e estimulando a migração de células epiteliais intestinais (IECs). A ativação de fibroblastos intestinais e expressão de mucinas protetoras podem ser induzidas por esse peptídeo antimicrobiano.⁽⁸¹⁾

O aumento de LL-37 e outros peptídeos antimicrobianos em urina de crianças com obstrução do trato urinário sugere a participação desses peptídeos durante estase urinária, prevenindo disfunção da barreira uroepitelial ou invasão bacteriana.⁽⁸²⁾

A lactose presente no leite materno possui a capacidade de induzir o gene CAMP em células epiteliais do cólon, favorecendo a proteção intestinal e regulando a microbiota neonatal. Apresenta ainda sinergismo com butirato e fenilbutirato no estímulo ao CAMP.⁽⁸³⁾

1.5 Seps: uma síndrome crítica

Milhões de pessoas em todo planeta são afetados pela seps anualmente, sendo a causa de morte de um em cada quatro pacientes atingidos. Sua incidência é comparada a politraumas, infarto agudo do

miocárdio ou acidente vascular cerebral, levando a necessidade de urgência e eficácia na terapêutica logo nas primeiras horas de evolução.⁽⁸⁴⁾

No Brasil, estima-se cerca de 600 mil novos casos de sepse por ano, com 30% de leitos ocupados em unidade de terapia intensiva (UTI), letalidade média de 50% dos casos e 16,5% dos atestados de óbito. Os custos de tratamento foram avaliados em US\$ 9,6 mil por paciente. Portanto, um relevante problema de saúde pública.⁽⁸⁵⁾

Sepse é uma síndrome decorrente de uma infecção e marcada por alterações fisiológicas, patológicas e bioquímicas. A atual definição descreve sepse como uma disfunção orgânica imbuída de ameaça a vida do paciente, devido à resposta desregulada frente à infecção.⁽⁸⁶⁾

O padrão-ouro para diagnóstico microbiológico consiste em análises dependentes de cultura. Entretanto, o perfil bacteriano na corrente sanguínea é incipiente, na maioria dos casos, dificultando a sensibilidade dos testes e exigindo grandes alíquotas de amostra. Técnicas automatizadas podem ser utilizadas para reduzir o tempo de hemocultura.⁽⁸⁷⁾

A análise de proteínas ou ácido nucleico, através de novas tecnologias, permitiu a agilidade na identificação dos microrganismos patogênicos, impactando sobre a utilização adequada de antibióticos, cuja relevância influencia a morbidade ou mortalidade dos pacientes.⁽⁸⁷⁾

O desafio de identificar biomarcadores com especificidade e sensibilidade em sepse, bem como em outras doenças graves, tem despertado o interesse de pesquisadores, devido a grande valia no diagnóstico e no prognóstico da doença. A procalcitonina (PCT) e a proteína C reativa são os marcadores mais utilizados apesar de suas sabidas limitações.^(88, 89)

A biologia de sistemas poderá contribuir com a tarefa de encontrar biomarcadores em sepse, mediante estudos de marcadores moleculares ou análise do metaboloma do plasma. Porém, a complexidade da sepse, as variáveis dos quadros clínicos e as diferenças na população de pacientes deverão ser considerados para que biomarcadores sejam validados.⁽⁸⁷⁾

1.5.1 Seps e sistema imunológico

Com intuito de danos ou doenças serem evitados, a imunidade atua na defesa e resistência contra antígenos, por intermédio de variadas e interligadas funções, como reconhecer o invasor, apresentá-lo, responder e regular a resposta, bem como secretar citocinas e quimiocinas.^(31, 90)

A seps, assim como algumas doenças críticas, decorre do desequilíbrio em uma vasta cadeia de mecanismos complexos, que incluem o sistema imunológico e os microrganismos patogênicos, os quais são reconhecidos pelas células do sistema imune inato, por meio de receptores e proteínas expressos em suas superfícies. Receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e receptores tipo *toll* (TLRs) são os mais prevalentes. Os PRRs possuem especificidade a antígenos microbianos dotados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), tais como lipopeptídeos, peptídeoglicanos, lipopolissacarídeos e ácido lipoteicóico.^(35, 88)

1.5.2 Seps e microbioma intestinal

Sugere-se que hospedeiros saudáveis possam ser habitados por variados ecossistemas microbianos estáveis.⁽³⁾ No entanto, para definição de microbioma saudável, alguns fatores devem ser considerados, como a diversidade taxonômica microbiana entre pessoas e entre populações, tendo em vista a idade, dieta e localização geográfica, bem como a adaptação da microbiota mediante variações do ambiente ou das condições do hospedeiro.^(3, 91)

Disbiose é o termo usado para alteração da composição e função do microbioma,^(3, 91) cuja redução dos microrganismos residentes e a aumento de bactérias patogênicas podem favorecer doenças graves. Infecções nosocomiais, pancreatite aguda, seps e síndrome de disfunção de multiórgãos tem sido relacionadas à disbiose.^(91, 92) O aumento de bactérias da família Enterobacteriaceae pode levar a inflamação e infecção.^(3, 91)

Pesquisadores demonstraram que a microbiota intestinal sofre influência dos fatores ambientais. Camundongos C57BL/6, adquiridos de diferentes

forneecedores, foram submetidos à sepse por injeção intraperitoneal de fezes. A análise das fezes dos animais mostrou significativas variações de microbiota. A diferença do quadro clínico entre os grupos foi bem evidenciada durante a sepse. E dezesseis meses após a sepse, a composição da microbiota estava alterada.⁽⁹³⁾

Ensaio com modelo animal de ligadura e punção cecal (CLP) mostrou similaridade pós-sepse entre a microbiota pulmonar e a intestinal. O pulmão apresentou aumento da diversidade bacteriana, indicando a imigração de novas espécies. Foi notada expressiva presença da ordem Bacteroidales, abundante no intestino de camundongos.⁽⁹⁴⁾

Pacientes com choque séptico, mantido por bactérias multirresistentes, tiveram seus prontuários analisados em estudo retrospectivo. O histórico de câncer e a presença de *Acinetobacter baumannii* foram correlacionados com o risco aumentado de morte em 30 dias.⁽⁹⁵⁾

A microbiota fecal de pacientes com sepse grave e estadia prolongada em UTI apresentou aumento de comunidades com diversidade baixíssima de patógenos multirresistentes, destacando-se associação entre gêneros *Enterococcus* e *Staphylococcus* e a família Enterobacteriaceae. Aproximadamente em 75% dos casos, foram identificadas *Candida albicans* e *Candida glabrata*.⁽⁹⁶⁾

1.5.2.1 Sepse e transplante fecal

Ratos submetidos à sepse por LPS apresentaram redução na diversidade da microbiota fecal. Contrariamente, o transplante de microbiota fecal (TMF) de animais saudáveis em animais com sepse recuperou a composição da microbiota. O TMF regulou a liberação de citocinas no hipocampo de animais sépticos. Pesquisadores sugeriram que o nervo vago seria o mediador entre microbiota intestinal e encefalopatia associada à sepse.⁽⁹⁷⁾

Transplante de microbiota fecal proporcionou melhora em pacientes acometidos por diarreia e disfunção de múltiplos órgãos (MOD) associada à sepse. O quadro clínico dos dois pacientes não apresentara melhora com a administração de antibióticos e antifúngicos. Cultura do sangue mostrou a

presença de *Acinetobacter baumannii* e *Burkholderia cepacia*, uma espécie em cada paciente. A análise da microbiota fecal de ambos revelou grave perturbação da microbiota intestinal. Fezes frescas de um doador foram homogeneizadas em solução salina e, após a filtração, realizou-se a infusão por sonda nasogástrica. Posteriormente, os pacientes apresentaram melhora clínica, restauração da composição e diversidade da microbiota intestinal comensal e alívio da resposta inflamatória.⁽⁹⁸⁾

1.5.3 Tríade: sepse, microbiota e sistema imunológico

Camundongos vacinados com antígenos de bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* foram submetidos ao modelo de sepse por inoculação intraperitoneal de solução salina tamponada com fosfato (PBS) mais *S. aureus*. A imunização intranasal proporcionou a inibição da produção de interleucina 10 (IL-10) e estimulou o aumento de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na defesa do hospedeiro. Reforçou o aumento da produção de IgG1 e IgG2a, contribuindo para menor carga bacteriana no fígado e no baço e melhora na sobrevivência dos animais.⁽⁹⁹⁾

Escherichia coli, bactéria Gram-negativa, pode causar sepse e meningite em neonatos.^(100, 101) Ensaio realizado com sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* GG sugeriram ação protetora contra infecção por *Escherichia coli* K1 em ratos neonatos, devido estímulo à maturação da defesa imune.⁽⁶²⁾

A administração endovenosa de LL-37 em camundongos submetidos ao modelo de ligadura e punção cecal (CLP) melhorou a sobrevivência dos animais. Pesquisadores evidenciaram essa melhora com resultados obtidos: supressão de piroptose de macrófagos, inibição de ativação de macrófagos intraperitoneais, redução de citocinas intracelulares e aumento de atividade antimicrobiana.⁽¹⁰²⁾

Estudo com bebês prematuros demonstrou que a presença de lactoferrina e peptídeos antimicrobianos (AMPs) no leite materno seria um fator de proteção contra sepse neonatal tardia (LOS). Os bebês pré-termo com LOS ingeriram menor quantidade de leite nos primeiros dias de vida e, portanto, menor concentração de AMPs.⁽¹⁰³⁾

Pacientes com sepse severa apresentaram níveis plasmáticos elevados de AMPs e lactoferrina, provenientes de grânulos azurófilos e específicos de neutrófilos, respectivamente. Intensa ativação inflamatória, em meio ao transtorno circulatório, foi evidenciada com os resultados obtidos no estudo.⁽¹⁰⁴⁾

A suplementação com colecalciferol (vitamina D3) elevou os níveis de 25-hidroxivitamina D (25OHD) total, 25OHD biodisponível e de LL-37 em pacientes com sepse grave e choque séptico. Houve correlação significativa entre 25OHD biodisponível e LL-37. Os níveis de citocinas IL-1 β e IL-6 apresentaram redução.⁽¹⁰⁵⁾

LL-37 citrulinada apresentou reduzida atividade anti-inflamatória em endotoxemia, exacerbando a sepse em camundongos sensibilizados por D-galactosamina. A citrulinização de LL-37, por meio da enzima peptidil-arginina deaminase (PAD), diminuiu a afinidade por LPS e aumentou níveis séricos de IL-6. Os animais apresentaram aumento de PAD no soro, o que possibilitaria a citrulização de LL-37 *in vivo*.⁽¹⁰⁶⁾

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do nosso trabalho é investigar se existe alteração na microbiota intestinal durante a sepse experimental e o papel do peptídeo antimicrobiano CRAMP neste cenário.

2.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos buscam:

- ✓ identificar se existem diferenças qualitativas ou quantitativas em camundongos saudáveis e submetidos à sepse experimental;
- ✓ investigar se a ausência da produção da catelicidina CRAMP interfere na diversidade da microbiota intestinal.

3 MÉTODOS

A metodologia e os recursos materiais utilizados em cada ensaio serão detalhados nesse capítulo, incluindo técnica cirúrgica, coleta de amostras, técnicas moleculares e estatísticas.

3.1 Local de experimentação

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Emergências Clínicas (LIM-51) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

3.2 Animais

Previamente, camundongos macho e fêmea *knock-out* (KO) para peptídeo antimicrobiano ligado à catelina (CRAMP), gene *Camp*^{tm1Rlg}, foram adquiridos do *The Jackson Laboratory*, USA. Os animais CRAMP KO foram mantidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP para adaptação e reprodução.

Trinta camundongos C57BL/6 (*wild type*) e trinta CRAMP KO, machos, com peso entre 20 e 30 gramas, após o desmame na quinta semana de vida, foram obtidos do biotério central e mantidos em gaiolas convencionais no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia, Departamento de Clínica Médica, em água e ração *ad libidum*, ciclo claro-escuro e temperatura ambiente parcialmente controlada. Em dias frios, a sala dos animais foi mantida aquecida por aquecedor portátil, porém, durante as noites, o mesmo era desligado.

Para os ensaios, a idade dos animais variou entre oito e dez semanas de vida (fase final reprodutiva).

Salienta-se que este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da USP com autorização nº 055/17 (Anexo).

3.2.1 Camundongos em gaiola metabólica

Para coleta de amostras fecais em gaiolas metabólicas, os animais foram seus próprios controles (saudáveis). Dez animais *wild type* (WT) e dez CRAMP KO formaram quatro grupos:

- animais adultos C57BL/6 WT (n=10), controle.
- animais adultos C57BL/6 WT (n=10), CLP.
- animais adultos CRAMP KO (n=10), controle.
- animais adultos CRAMP KO (n=10), CLP.

Todos os animais passaram por procedimento cirúrgico de ligadura e punção cecal (CLP) para indução de sepse experimental.

3.2.2 Camundongos em gaiola convencional

Os camundongos foram mantidos em gaiolas convencionais em quantidades variáveis, segundo cada ninhada.

Vinte animais WT e vinte CRAMP KO foram divididos em quatro grupos, a saber:

- animais adultos C57BL/6 WT (n=10), controle.
- animais adultos C57BL/6 WT (n=10), CLP.
- animais adultos CRAMP KO (n=10), controle.
- animais adultos CRAMP KO (n=10), CLP.

Metade dos camundongos foi submetida à cirurgia de ligadura e punção cecal (CLP) para indução de sepse severa. Foram coletados sangue e órgãos específicos de todos os animais.

3.3 Coletas de amostras fecais

Dois animais (um WT e um CRAMP KO) foram mantidos simultaneamente em gaiolas metabólicas adquiridas da Tecniplast, Itália.

As coletas de fezes foram realizadas em tubos transparentes estéreis acoplados à própria gaiola e os *pellets* foram transferidos para tubos com rosca, mantidos em nitrogênio líquido até acomodação em *freezer* com temperatura - 80°C. As gaiolas passaram por esterilização em calor úmido após cada ciclo de coletas.

A primeira coleta ocorreu após segregação de 24 horas do animal em gaiola metabólica, objetivando a captação dos excrementos autocontroles. Os animais foram retirados das gaiolas e submetidos ao modelo animal de ligadura e punção fecal (CLP).

Após a cirurgia, os animais permaneceram segregados nas gaiolas metabólicas e novas coletas de fezes foram realizadas 24 horas após a CLP.

Durante a estadia nas gaiolas, os animais receberam água e ração *ad libidum*. Com objetivo de minimizar correntes de ar frio durante as noites geladas de inverno, cada gaiola foi coberta por um saco plástico.

3.4 Coletas de sangue e órgãos específicos

Dez camundongos WT e dez CRAMP KO foram submetidos à CLP e após o procedimento cirúrgico permaneceram em gaiolas no biotério.

Decorridas vinte e quatro horas, os animais receberam anestésico e uma incisão tóraco-abdominal foi realizada. A artéria cava foi puncionada com agulha de tuberculina calibre G 27,5 e o sangue total aspirado, armazenado em microtubos e imerso em gelo. Pulmão direito e esquerdo, cólon ascendente e íleo terminal foram coletados. Uma incisão dorsal próximo à base do crânio foi realizada para coleta do córtex cerebral. Os órgãos foram armazenados em tubos com tampa de rosca e imersos em nitrogênio líquido, e posteriormente, alocados em *freezer* com temperatura - 80 °C.

Os grupos de camundongos saudáveis (WT e CRAMP KO) foram submetidos às coletas do sangue e dos órgãos mencionados.

3.4.1 Separação de plasma e de hemácias

O sangue coletado foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos a 4 °C. O plasma sobrenadante foi pipetado, armazenado em tubo com tampa de rosca e imerso em nitrogênio.

A solução de lise de hemácias foi preparada com 150 mM de cloreto de amônia (NH_4Cl), 10 mM de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 0,1 mM de EDTA. O *pellet* de células sanguíneas foi resuspenso com 1 mL de solução de lise e transferido para tubo falcão (F15), sendo adicionados mais 4 mL de solução. Após incubação em gelo por 10 minutos, a suspensão foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante desprezado.

O *pellet* celular foi resuspenso novamente com 1 mL de solução de lise e transferido para microtubo. Após incubação em gelo por 10 minutos, a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 2 minutos a 4 °C e o sobrenadante desprezado.

As células restantes foram lavadas com 1 mL de PBS e em seguida centrifugadas a 4000 rpm por 2 minutos a 4 °C e o sobrenadante desprezado. O último *pellet* continha leucócitos, que foram resuspenso em trizol, armazenados em tubo com tampas de rosca e imersos em nitrogênio.

Plasma e leucócitos foram mantidos em *freezer* com temperatura - 80 °C.

3.4.2 Pulverização de órgãos coletados

Cólon ascendente, íleo terminal, córtex cerebral e pulmão foram retirados do *freezer* e mantidos em nitrogênio líquido, sendo extraídos um a um dos tubos e pulverizados. O pó obtido foi dividido em dois tubos, sendo que em um deles foi acrescentado 1 mL de trizol. Todo material foi devolvido ao *freezer* em temperatura de - 80 °C.

3.5 Técnicas aplicadas

As técnicas utilizadas estão estabelecidas em literatura, tais como modelo de ligadura e punção cecal, extração de DNA e RNA, amplificação e detecção em RT-qPCR e imunofluorescência em Milliplex e Elisa.

3.5.1 Modelo animal em sepse: ligadura e punção cecal (CLP)

Após o período de adaptação individual de vinte e quatro horas em gaiola metabólica, os camundongos foram retirados, pesados e anestesiados.

Preparou-se solução anestésica com 5 mL de ketamina (50 mg/kg), 2 mL de xilazina a 2% e 7 mL de solução fisiológica salina, e administrou-se 0,12 mL para cada 20 g de peso do animal, via intraperitoneal, anteriormente ao procedimento cirúrgico.

Uma laparotomia foi realizada com incisão vertical à esquerda inferior do abdome dos camundongos e a alça do ceco foi exposta, sendo ligada por linha de algodão a um centímetro da extremidade distal. A membrana cecal foi perfurada duas vezes com agulha estéril de calibre 21 a 2 mm da porção terminal. O ceco foi pressionado de maneira a expor uma gotícula da matéria digestiva, sendo reintroduzido à cavidade abdominal e realizada a sutura da incisão com três pontos de linha de nylon cirúrgica. Ao cessar o efeito da anestesia, os animais foram individualmente recolocados nas gaiolas. As coletas de fezes foram realizadas vinte e quatro horas após a cirurgia e os animais sacrificados com doses letais de anestésico.

Dois grupos de camundongos (WT CLP e CRAMP KO CLP) alocados em gaiolas convencionais também foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito acima.

3.5.2 Extração de DNA em amostras fecais

Utilizou-se o protocolo para extração de DNA em fezes para detecção de patógenos, conforme *QIAmp® DNA Stool Handbook*.⁽¹⁰⁷⁾ Os reagentes usados foram provenientes do *QIAmp DNA Stool Mini Kit*, Qiagen, Alemanha.

As amostras retiradas do *freezer* a temperatura de - 80 °C foram dispostas em gelo para descongelamento gradual. As amostras fecais de animais submetidos à CLP tiveram peso inferior ao peso ideal recomendado pelo protocolo (180 mg a 220 mg). Com o intuito de manter um peso aproximado entre as amostras, utilizou-se como parâmetro a quantidade de *pellets* – de 2 a 3 *pellets* por amostra.

Os *pellets* foram reduzidos a pequenas partículas com o auxílio de ponteiros de pipetas. Após adição de 1,4 mL de *Buffer* ASL, cada amostra foi homogeneizada por um minuto em vórtex.

As suspensões foram aquecidas a temperatura de 95 °C por 5 minutos, com objetivo de melhorar o rendimento total de DNA e auxiliar a lise bacteriana. Em seguida, elas foram agitadas por vórtex por 15 segundos e centrifugadas em alta rotação por um minuto. O sobrenadante foi pipetado em tubo com tampa de rosca (2 mL) e o *pellet* desprezado.

Após adição de um comprimido *InhibitEX*, as suspensões foram agitadas em vórtex por um minuto, incubadas em temperatura ambiente por um minuto e centrifugadas a 15000 rpm por três minutos a temperatura de 24 °C, para precipitação dos inibidores ligados a matrix *InhibitEX*. O sobrenadante foi pipetado em microtubo de 1,5 mL e o *pellet* desprezado.

As amostras foram centrifugadas em alta rotação por três minutos. Em novos microtubos foram pipetados e agitados em vórtex: 15 µL de proteinase K, 200 µL do sobrenadante e 200 µL de *Buffer* AL. Após incubação da solução a temperatura de 70 °C por 10 minutos, 200 µL de etanol absoluto foram adicionados e agitados em vórtex.

Os lisados obtidos foram transferidos completamente para colunas de *spin* QIAmp alocadas em tubo de 2 mL. Após a centrifugação em alta rotação por um minuto, as colunas de *spin* QIAmp foram colocadas em novos tubos de 2 mL e os filtrados descartados.

Interessante mencionar que o *Buffer* AW1 e AW2 foram previamente diluídos em etanol absoluto em volume de 25 mL e 30 mL respectivamente.

Alíquotas de 500 µL de *Buffer* AW1 foram adicionadas a cada coluna. Após a centrifugação em alta rotação por um minuto, as colunas de *spin* QIAmp foram colocadas em novos tubos de 2 mL e os filtrados descartados.

Alíquotas de 500 µL de *Buffer* AW2 foram pipetadas em cada coluna. Após a centrifugação em alta rotação por três minutos, as colunas de *spin* QIAmp foram colocadas em novos tubos de 2 mL e os filtrados descartados.

Os tubos contendo as colunas foram centrifugados em alta rotação por um minuto, com intuito de eliminar possíveis resíduos de *Buffer* AW2.

Por fim, 200 µL de *Buffer* AE (*elution buffer*) foram pipetados diretamente sobre cada membrana das colunas, já alocadas em novos microtubos, os quais foram incubados em temperatura ambiente por um minuto. Em seguida, os tubos foram centrifugados em máxima rotação por um minuto. A diluição de DNA obtida foi armazenada em *freezer* a temperatura de - 20 °C.

3.5.3 Quantificação de DNA e RNA por espectrofotometria

As amostras de DNA foram gradual e previamente descongeladas em gelo. A concentração e a integridade do DNA foram avaliadas usando o espectrofotômetro NanoVue Plus, GE. O equipamento foi zerado com 1 µL de *Buffer* AE e as amostras foram quantificadas.

O mesmo procedimento foi adotado para quantificação de RNA purificado dos órgãos e leucócitos, sendo utilizados 2 µL de água DEPC para zerar o equipamento.

3.5.4 Eletroforese em gel de agarose a 2%

A solução tampão foi preparada com água destilada e Trisborato ETDA (TBE) em proporção de 9:1. Em 100 mL de solução foram adicionadas 2 g de agarose e a mistura foi homogeneizada em microondas por dois minutos. Acrescentaram-se 5 µL de brometo de etídio a 10 mg/mL, o qual possui afinidade pela dupla fita de DNA. O preparado foi colocado em cuba de eletroforese e aguardaram-se 15 minutos. Após a polimerização, acrescentou-se o restante da solução inicial.

Quatro amostras de DNA extraído de fezes foram escolhidas e submetidas a teste com os *primers* específicos de bactérias. Após análise em PCR, acrescentaram-se 8 µL de corante azul e 1,5 µL de *ladder* em cada *well*

da placa. Alíquotas de 20 μ L foram retiradas e pipetadas em pocinhos na cuba de eletroforese. A corrente elétrica do polo negativo ao positivo foi mantida entre 100 e 102 voltz por 50 minutos. As bandas obtidas em gel de agarose foram detectadas em G:Box e as imagens capturadas em aplicativo Genesys (Syngene, Synoptics Group, USA).

3.5.5 Eletroforese em gel de agarose a 1,5%

O protocolo para preparo de gel de agarose a 1,5% foi semelhante ao preparo de 2%, observada a quantidade de agarose usada de 1,5 g.

Quatro diferentes amostras de RNA purificado dos órgãos e de leucócitos foram escolhidas e submetidas a teste com os *primers* específicos (CRAMP, α -defensina 5 e β -defensina 1, 2 e 3). Após análise em PCR, acrescentaram-se 8 μ L de corante azul e 1,5 μ L de *ladder* em cada *well* da placa. Alíquotas de 20 μ L foram retiradas e pipetadas em pocinhos na cuba de eletroforese. A corrente elétrica do polo negativo ao positivo foi mantida entre 100 e 102 voltz por 40 minutos. As bandas obtidas em gel de agarose foram detectadas em G:Box e as imagens capturadas em aplicativo Genesys (Syngene, Synoptics Group, USA).

3.5.6 Investigação de bactérias em amostras fecais em qPCR

A investigação do microbioma intestinal foi realizada em amostras de DNA obtidas de fezes de camundongos. Os ensaios foram baseados em amplificação de *primers* em PCR e detecção por sonda de hidrólise, tendo como gene-alvo 16S rRNA.

Foram utilizados dois equipamentos termocicladores *Step One Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems, USA) com capacidade para 96 e 48 amostras. O programa *Step One Software v2.2* (Applied Biosystems, USA) foi usado para configuração dos experimentos, controle da ciclagem térmica, coleta e análise dos dados obtidos. Aplicaram-se dois formatos para pesquisa de bactérias: kit para PCR *array* de DNA microbiano em doenças metabólicas e *primers* específicos de espécies bacterianas encontradas no intestino.

3.5.6.1 Investigação de bactérias com kit para PCR array de DNA microbiano

Utilizou-se o protocolo “Real-Time PCR using microbial DNA qPCR array 96-well formats”, segundo *Microbial DNA qPCR Handbook*.⁽¹⁰⁸⁾ Os reagentes usados foram provenientes do *QIAmp DNA Stool Mini Kit*, Qiagen, Alemanha. A qPCR array de DNA microbiano em doenças metabólicas possibilita a pesquisa de bactérias em fezes ou outras amostras advindas do intestino, associadas a obesidade, diabetes mellitus e outras doenças.

O kit utilizado possibilitou ensaio para 45 espécies de bactérias, contemplando ainda ensaio com Pan-bacteria (controle positivo), o qual detecta um amplo range de espécies bacterianas, e ensaio controle positivo de PCR, que testa a presença de inibidores de PCR e a eficiência da PCR. Deve-se mencionar que a análise para *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* e outras espécies não foi específica, devido à região analisada ser semelhante nessas espécies.

Após o descongelamento das amostras de DNA, *mastermix* e água livre de DNA microbiano, um rápido *spin* foi realizado em cada microtubo.

O mix de reação foi preparado com 1275 µL de *mastermix*, 500 ng de DNA e água livre de DNA microbiano para completar o volume total de 2550 µL. Alíquotas de 25 µL do mix de reação foram pipetadas em cada *well* da placa de PCR. Após selar a placa com filme adesivo óptico, realizou-se centrifugação manual por 30 segundos. Por fim, a placa foi acomodada na bandeja do termociclador e a PCR iniciada.

Os ciclos programados contemplaram:

- ✓ ativação inicial da PCR, 10 minutos a 95 °C, um ciclo;
- ✓ ciclagem com 40 ciclos:
 - desnaturação, 15 segundos a 95 °C;
 - anelamento e extensão, 2 minutos a 60 °C.

Após a finalização da ciclagem, os *threshold cycle* (CT) foram ajustados e transferidos para planilha em Excel elaborada pela Qiagen.

3.5.6.2 Investigação de bactérias com primers específicos

Oligonucleotídeos adquiridos da Thermo Fisher Scientific foram resuspensores com 90 µL de água para PCR de DNA, agitados em rápido *spin* e armazenados a temperatura de - 20 °C. As bactérias *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* *coccoides*, *Enterococcus* *faecalis*, *Enterococcus* *faecium*, *Escherichia coli* e bactéria filamentosa segmentada (SFB) foram investigadas em amostras de DNA fecal e para normalização utilizou-se *primers* para bactéria universal. As sequências de *primers* utilizados encontram-se listadas na tabela 1.

Tabela 1 – Sequência de *primers* bacterianos estudados

PRIMER	SEQUÊNCIA (5' A 3')
<i>Lactobacillus</i> spp sense	AGCAGTAGGGAATCTTCCA
<i>Lactobacillus</i> spp reverse	CACCGCTACACATGGAG
<i>Bifidobacterium</i> spp sense	GGGTGGTAATGCCGGATG
<i>Bifidobacterium</i> spp reverse	TAAGCGATGGACTTTCACACC
<i>Clostridium</i> <i>coccoides</i> sense	AAATGACGGTACCTGACTAA
<i>Clostridium</i> <i>coccoides</i> reverse	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> sense	CCATGTGTAGCGGTGAAATG
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> reverse	CGGAAACCCTCCAACACTTA
<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> sense (*)	AGCTTGCTCCACCGGAAAAAGA
<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> reverse (*)	ATCCATCAGCGACACCCGAA
<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> sense	CCATGTGTAGCGGTGAAATG
<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> reverse	CGGAAACCCTCCAACACTTA
Bactéria filamentosa segmentada sense	AGGAGGAGTCTGCGGCACATTAGC
Bactéria filamentosa segmentada reverse	TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG
s- <i>Escherichia coli</i> sense	GAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG
s- <i>Escherichia coli</i> reverse	GAGACTCAAGCTKRCCAGTATCAG
Bactéria universal sense	TCCTACGGGAGGCAGCAGTG
Bactéria universal reverse	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT

(*) *Primers* defeituosos substituídos.

Alíquotas das amostras de DNA fecais foram previamente diluídas a 20 ng/µL com *Buffer* AE, perfazendo 50 µL de amostra diluída, sendo mantidos em *freezer* em temperatura de - 20 °C.

Após o descongelamento dos reagentes e amostras de DNA, um rápido *spin* foi realizado em cada microtubo. Preparou-se o mix de reação para cada

amostra com 10 µL de *syber mix*, 6,8 µL de água livre de DNA microbiano, 1 µL de *primer* sense, 1 µL de *primer* reverse e 0,2 µL de *ROX*, e em seguida, a mistura foi agitada em vórtex.

Foram pipetados 19 µL de mix de reação e 1 µL de amostra de DNA em cada *well* da placa para PCR. Após selar a placa com filme adesivo óptico, realizou-se centrifugação manual por 30 segundos. Então, a placa foi acomodada na bandeja do termociclador e a PCR iniciada.

Os ciclos programados contemplaram:

- ✓ ativação inicial do PCR, 10 minutos a 95 °C, um ciclo;
- ✓ ciclagem com 35 ciclos: desnaturação, 15 segundos a 95 °C; anelamento, um minuto a 60 °C; extensão, 45 segundos a 72 °C.

Após a finalização da ciclagem, os *threshold cycle* (CT) foram ajustados e transferidos para planilha em Excel.

3.5.7 Purificação de RNA em órgãos coletados

As amostras de tecidos pulverizados mantidos em trizol foram retiradas do *freezer*, dispostas em gelo para descongelamento gradual e, em seguida, incubadas em banho seco em temperatura de 65 °C por 10 minutos. Alíquota de 200 µL de clorofórmio foi adicionada em cada amostra. Após vigorosa agitação em vórtex, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por três minutos e centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi pipetado e transferido para novo tubo. Foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado e o tubo vertido várias vezes durante incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante desprezado, mantendo-se o *pellet* no tubo.

Alíquota de 1 mL de etanol a 70% gelado, preparado com água DEPC, foi adicionada ao *pellet* e o tubo agitado afim de homogeneizar o conteúdo. Novamente, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado, aguardando-se cinco minutos até que o etanol evaporasse. O *pellet* foi resuspenso em água DEPC, em volume variável de

10 µL a 50 µL, de acordo com o tamanho visualizado. A suspensão de RNA foi armazenada em *freezer* em temperatura de - 80 °C.

3.5.8 Investigação de defensinas em PCR

Oligonucleotídeos adquiridos da Thermo Fisher Scientific foram resuspensores com 90 µL de água DEPC, agitados em rápido *spin* e armazenados a temperatura de - 20 °C. As defensinas α -5 e β -1, 2 e 3 foram investigadas em amostras de RNA purificado obtido de órgãos (cólon ascendente, íleo terminal, córtex cerebral e pulmão) e leucócitos. As sequências de *primers* de defensinas utilizadas encontram-se listadas na tabela 2. O gene endógeno utilizado para normalização dos resultados de RNA foi o HPRT1.

Tabela 2 – Sequência de *primers* de defensinas estudadas

PRIMER	SEQUÊNCIA (5' A 3')
Alfa defensina-5 <i>mouse</i> sense	TATCTCCTTTGGAGGCCAAG
Alfa defensina-5 <i>mouse</i> reverse	CAGCTGCAGCAGAATACGAA
Beta defensina-1 <i>mouse</i> sense	CAGATGGAGCCAGGTGTTG
Beta defensina-1 <i>mouse</i> reverse	AACAGTTGGGCTTATCTGGTTT
Beta defensina-2 <i>mouse</i> sense	CTGCTGATATGCTGCCTCCT
Beta defensina-2 <i>mouse</i> reverse	AGGGGTTCTTCTCTGGGAAA
Beta defensina-3 <i>mouse</i> sense	TGTTTGCATTTCTCCTGGTG
Beta defensina-3 <i>mouse</i> reverse	TCTCTTGCAGCATTTGAGGA

Alíquotas das amostras de RNA purificado foram previamente diluídas a 20 ng/µL com água DEPC, perfazendo 100 µL de amostra diluída, sendo mantidos em *freezer* em temperatura de - 20 °C.

Após o descongelamento dos reagentes e amostras de RNA, um rápido *spin* foi realizado em cada microtubo. Preparou-se o mix de reação para cada amostra com 7,5 µL de *syber mix*, 1,75 µL de água DEPC, 0,3 µL de enzimas Taq polimerase, 0,15 µL de *primer* sense, 0,15 µL de *primer* reverse e 0,15 µL de ROX, e em seguida, a mistura foi agitada em vórtex.

Foram pipetados 10 µL de mix de reação e 5 µL de amostra de RNA a 20 ng/µL em cada *well* da placa para PCR. Após selar a placa com filme

adesivo óptico, realizou-se centrifugação manual por 30 segundos. Então, a placa foi acomodada na bandeja do termociclador e a PCR iniciada.

Os ciclos programados contemplaram:

- ✓ ativação inicial do PCR, 10 minutos a 50 °C e cinco minutos a 95 °C, um ciclo;
- ✓ ciclagem com 35 ciclos: desnaturação, 15 segundos a 95 °C; anelamento, 30 segundos a 60 °C; extensão, 30 segundos a 72 °C.

Após a finalização da ciclagem, os *threshold cycle* (CT) foram ajustados e transferidos para planilha em Excel.

3.5.9 Purificação de proteínas

Soluções de NaCl a 5M e Tris a 1M, pH 8,0, foram preparadas e utilizadas no tampão de lise para proteínas. Utilizou-se 2,922 g de NaCl (PM: 58,44 g) em 10 mL de água destilada para primeira solução. Dissolveu-se 6,057 g de Tris base (PM: 121,14 g) em 50 mL de água destilada e aferiu-se o pH para solução de Tris a 1M.

No preparo do tampão foram misturados 1 mL de Tergitol a 100%, 10 mL de glicerol puro, 2,7 mL de NaCl a 5M, 2 mL de Tris a 1M (pH 8,0) em volume de água suficiente para 100 mL de solução, sendo conservada em geladeira em temperatura de 4 °C.

No momento do uso do tampão de lise, foram acrescentados 4 µL de PMSF (inibidor de protease de serina) a 250 mM por mililitro de solução de extração.

As amostras de tecidos pulverizados foram retiradas do *freezer*, dispostas em gelo para descongelamento gradual. Alíquota de 1 mL do tampão de lise foi utilizada para cada 100 mg de tecido. As amostras foram mantidas em gelo e agitadas em gangorra por 30 minutos, e em seguida, centrifugadas a 10000 rpm a 4 °C por 30 minutos.

Para facilitar a utilização, alíquotas de amostras de proteínas foram pipetadas em placas para Elisa e Milliplex, sendo mantidas em *freezer* em temperatura a - 80 °C.

Importante ressaltar que os tecidos usados, nessa etapa, foram íleo terminal e pulmão, sendo que escolha foi justificada pelos resultados obtidos em PCR.

3.5.10 Quantificação de proteínas totais

A curva padrão foi elaborada a partir da diluição seriada de albumina de soro bovino, sendo água destilada considerada padrão zero. Após descongelamento, alíquotas de 5 µL de amostras de proteínas foram diluídas em 45 µL de água destilada, ou seja, diluição em dez vezes.

A alíquota de 2,8 mL de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*) foi diluída em 11,2 mL de água destilada. Para cada 10 µL de amostra diluída foram pipetados 200 µL de Bradford diluído.

A leitura de proteínas foi realizada em MAGPIX®, programa Luminex xPONENT, Luminex xMAP technology, USA.

3.5.11 Quantificação de citocinas em imunoensaio

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α foram pesquisadas em tecidos (íleo terminal e pulmão) usando o kit de MILLIPLEX® Map, Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, EMD Millipore, MA, USA, conforme instruções do fabricante.

Foram preparadas as soluções de *beads* de anticorpos imobilizados, padrão, *wash buffer* e controle de qualidade. As *beads* foram sonicadas por 30 segundos e agitadas em vórtex por 1 minuto. Em seguida, foram pipetados 60 µL de *beads* de cada tubo e 2700 µL de *wash buffer* em frasco de mistura, agitando em vórtex.

O padrão de citocinas de camundongo foi reconstituído com 250 µL de água deionizada, sendo misturado e agitado em vórtex por 10 segundos. Alíquotas de 200 µL de *assay buffer* foram pipetadas em cinco microtubos. A diluição seriada foi realizada com adição 50 µL de padrão reconstituído para o próximo tubo e assim alíquotas de igual volume foram transferidas tubo a tubo.

O *wash buffer* foi mantido em temperatura ambiente e misturado para trazer os sais na solução. A alíquota de 60 µL de *buffer* foi diluída em 540 mL de água deionizada.

Os controles de qualidade 1 e 2 foram reconstituídos com 250 µL de água deionizada, misturados e agitados em vórtex.

Todos reagentes foram mantidos em temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes do ensaio. Alíquotas de 200 µL de *wash buffer* foram pipetadas em cada *well* da placa, a qual foi coberta e agitada em *shaker* a 150 rpm, temperatura ambiente, por 10 minutos. Após o conteúdo ter sido descartado, 25 µL de padrão ou controle foram transferidos para os *wells* adequados. *Assay buffer* foi utilizado padrão zero (background). Alíquotas de 25 µL de *assay buffer* foram pipetadas nos *wells* de amostras. A solução de tampão de lise – preparada para lise de proteínas – foi transferida em volume de 25 µL aos *wells* padrão, *background* e controle. Alíquotas de 25 µL de amostras de proteínas foram adicionadas nos *wells* com *assay buffer*. O frasco com mistura de *beads* foi agitado em vórtex e 25 µL da mistura adicionado em cada *well*.

A placa selada foi mantida em *shaker* a 150 rpm, temperatura de 2 °C a 8 °C, por 18 horas. Após a incubação, a placa foi mantida em *shaker* em temperatura ambiente e, em seguida, o conteúdo descartado.

O procedimento de lavagem da placa foi realizado duas vezes. A placa foi mantida em placa de imã por 1 minuto. Foram adicionados 200 µL de *wash buffer* em todos *wells*, sendo agitados em *shaker* a 150 rpm por 30 segundos. Novamente, a placa foi alocada em placa de imã por 1 minuto.

Adicionaram-se 25 µL de anticorpo de detecção em cada *well*. A placa selada foi incubada e agitada em *shaker* por 60 minutos em temperatura ambiente. Alíquotas de 25 µL de Streptavidin-Phycoerythrin foram adicionadas em cada *well*. Nova incubação foi realizada por 30 minutos em *shaker*. O conteúdo da placa foi descartado e o procedimento de lavagem repetido duas vezes.

Acrescentaram-se 150 µL de *Drive Fluid* em cada *well*. As *beads* foram resuspensoes em *shaker* por 5 minutos.

A leitura das citocinas foi realizada em MAGPIX®, programa Luminex xPONENT, Luminex xMAP technology, USA.

3.5.12 Detecção e quantificação de defensinas por imunoenensaio

As defensinas α -7 e β -1 foram pesquisados em tecidos (íleo terminal e pulmão) de camundongos utilizando o kit de Elisa, MyBioSource, USA, de acordo com manuais do fabricante.

A leitura de absorbância da densidade óptica em 450 nm foi realizada em MAGPIX®, programa Luminex xPONENT, Luminex xMAP technology, USA.

3.5.12.1 Imunoenensaio para α -defensina 7

Antes de iniciar o ensaio, *wash solution* (1x) foi diluída em água destilada em cem vezes, perfazendo o total de 1000 mL de *wash solution* (100x). Todos os reagentes foram mantidos em temperatura ambiente (20 °C - 25 °C).

Os frascos com solução padrão foram agitados. Alíquotas de 100 μ L de padrão ou amostras de proteínas foram pipetadas em cada *well* da placa. Para controle foram usados 100 μ L de tampão de lise de proteínas. Em cada *well* contendo apenas amostras, adicionaram-se 10 μ L de *balance solution*. Alíquotas de 50 μ L de *conjugate* foram misturadas em cada *well*, exceto no controle. A placa foi coberta e incubada em temperatura a 37 °C, por 60 minutos. Em seguida, o conteúdo da placa foi desprezado.

O procedimento de lavagem da placa foi realizado cinco vezes. Todos os *wells* foram preenchidos com *wash solution* (1x), e então, o conteúdo descartado.

Em cada *well*, adicionaram-se 50 μ L de substrate A e 50 μ L de substrate B. Novamente, a placa foi coberta e incubada em temperatura a 37 °C, por 15 minutos, podendo permanecer incubada no máximo por 30 minutos, até obter cor escura. Misturaram-se bem alíquotas de 50 μ L de *stop solution* em cada *well*.

3.5.12.2 Imunoensaio para β -defensina 1

As proteínas purificadas previamente foram diluídas em tampão de lise de proteínas na proporção 1:1. Os reagentes foram mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos antes do uso.

Foram preparadas as soluções *wash buffer*, *standard*, *biotin-labeled antibody* e conjugado HRP-streptavidina (SABC). Alíquota de 30 mL de *wash buffer* concentrado (25x) foi diluída em 750 mL de água destilada.

Alíquotas de 0,3 mL de diluente de amostra foram transferidas para seis microtubos. O volume de 0,3 mL de *standard* (50 ng/mL) foi transferido para o primeiro microtubo e uma diluição em série realizada. O diluente de amostra foi considerado como padrão zero.

A alíquota de 1 mL de *biotin-labeled antibody* concentrado foi diluído em 99 mL de *antibody dilution buffer*, uma hora antes do ensaio.

A alíquota de 1 mL de SABC foi diluído em 99 mL de *SABC dilution buffer*, trinta minutos antes do ensaio.

A placa foi lavada duas vezes com 350 μ L de *wash buffer* e o conteúdo descartado. Alíquotas de 100 μ L de *standard* ou amostras de proteínas foram pipetadas em cada *well* da placa, sendo incubada em temperatura a 37 °C, por uma hora e trinta minutos. Após a incubação, o conteúdo da placa foi desprezado.

O procedimento de lavagem da placa foi realizado duas vezes. Os *wells* foram preenchidos com 350 μ L de *wash buffer* e, em seguida, todo conteúdo descartado.

Adicionaram-se 100 μ L de *biotin-labeled antibody* em cada *well* e, novamente, a placa foi incubada em temperatura a 37 °C, por 60 minutos. O conteúdo da placa foi descartado e a lavagem realizada por três vezes.

Foram pipetados 100 μ L de SABC em cada *well* e realizada incubação em temperatura a 37 °C, por 30 minutos. Prosseguiu-se com o descarte do conteúdo e cinco repetições de lavagem com *wash buffer* dentro dos *wells* de 1 a 2 minutos.

Alíquotas de 90 μ L de TMB *substrate* foram acrescentadas e a placa incubada em local escuro em temperatura a 37 °C, por até 30 minutos. O

volume de 50 μ L de *stop solution* foi pipetado em cada *well*, finalizando a reação.

3.6 Análise de dados e métodos estatísticos

A normalidade dos dados foi avaliada com os testes D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Na estatística, considerou-se análise de variância de duplo fator com utilização de ANOVA para distribuição normal e Kruskal-Wallis para distribuição não paramétrica. Em análise *post-hoc* utilizou-se teste U de Mann-Whitney. O programa utilizado para estatística foi o Prism 7 for Windows, versão 7.05, GraphPad Software Inc, USA.

Em testes não paramétricos, os dados foram transformados em escores (*ranks*) progressivos e a média e desvio-padrão calculados a partir dos escores. Os resultados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão, sendo considerado estatisticamente significativo *p*-valor < 0,05.

4 RESULTADOS

Os resultados observados em análise de DNA fecal, RNA em tecidos e leucócitos, citocinas e peptídeos antimicrobianos em tecidos serão descritos nesse capítulo.

4.1 Identificação de bactérias em amostras fecais

Para melhor resultado na análise de DNA fecal, esperava-se a concentração entre 75 e 300 ng/μL (conforme *QIAmp® DNA Stool Handbook*),⁽¹⁰⁷⁾ porém vinte e cinco por cento das amostras apresentaram concentração inferior a 75 ng/μL e uma amostra maior que 300 ng/μL. A integridade do DNA foi avaliada pela razão entre 1,7 e 2,0.

4.1.1 Bactérias pesquisadas em *kit* para PCR *array* de DNA

As espécies bacterianas analisadas em *kit* para qPCR *array* da Qiagen encontram-se citadas na tabela 3 e somente aquelas identificadas foram destacadas.

Tabela 3 – Bactérias investigadas em *kit* para qPCR *array* da Qiagen nas amostras fecais de camundongos

PRINCIPAIS BACTÉRIAS ENCONTRADAS EM DISTÚRBIOS METABÓLICOS		
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Coprococcus eutactus</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>
<i>Akkermansia muciniphila</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Alistipes putredinis</i>	<i>Desulfovibrio piger</i>	<i>Prevotella copri</i>
<i>Anaerotruncus colihominis</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	<i>Ruminococcus gnavus</i>
<i>Bacteroides coprocola</i>	<i>Dorea formicigenerans</i>	<i>Ruminococcus torques</i>
<i>Bacteroides eggerthii</i>	<i>Eubacterium rectale</i>	<i>Sporobacter termitidis</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Bacteroides intestinalis</i>	<i>Fingoldia magna</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Escherichia coli</i>

PRINCIPAIS BACTÉRIAS ENCONTRADAS EM DISTÚRBIOS METABÓLICOS

<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Lachnobacterium bovis</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Collinsella aerofaciens</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Coprococcus comes</i>	<i>Parabacteroides merdae</i>	<i>Subdoligranulum variabile</i>

FONTE: Qiagen.⁽¹⁰⁹⁾

NOTA: As bactérias identificadas *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides vulgatus* e agrupamento com *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* estão destacadas.

4.1.1.1 Espécies identificadas através do kit da Qiagen

Utilizou-se o método C_T comparativo na análise de resultados obtidos, tendo como referencial o grupo controle *wild type* saudável (delta C_T). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

Dentre as 45 espécies passíveis de identificação através do kit da Qiagen foram encontradas bactérias *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides vulgatus* e, devido à semelhança do gene 16S RNA, o grupo de espécies *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*, alocadas no mesmo *well*, também foi amplificado.

Os grupos analisados não apresentaram diferença estatística significativa para espécie *Akkermansia muciniphila*. O grupo WT CLP (*wild type* em sepse) teve o maior desvio padrão quando comparado aos demais grupos (gráfico 1A).

No estudo de bactérias *Bacteroides vulgatus*, observou-se aumento significativo nos grupos *wild type* controle (WT C) e WT CLP em relação aos grupos CRAMP KO controle (KO C) e em sepse (KO CLP), respectivamente (gráfico 1B). Os grupos WT C e WT CLP mostraram semelhança estatística entre si, assim como os grupos KO C e KO CLP. O maior desvio padrão ocorreu no grupo WT CLP.

O agrupamento de espécies *Escherichia coli*, *Shigella boydii*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* e *Shigella flexneri*, apresentou

maior abundância significativa no grupo WT CLP em relação ao WT C (gráfico 1C), enquanto os demais grupos tiveram semelhança estatística.

Gráfico 1 – Análise da abundância relativa de bactérias *Akkermansia muciniphila* (A), *Bacteroides vulgatus* (B) e o grupo de espécies *Escherichia coli*, *Shigella boydii*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* e *Shigella flexneri* (C), em amostras fecais dos grupos de camundongos: *wild type* controle (WT C), *wild type* em sepse (WT CLP), CRAMP KO controle (KO C) e CRAMP KO em sepse (KO CLP)

4.1.2 Bactérias específicas

A migração em gel de agarose para *primers* específicos de bactérias confirmou a presença de *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* *coccoides*, *Escherichia coli*, bactéria filamentosa segmentada (SFB) e bactéria universal, exceto *Enterococcus faecium*.

Novos *primers* de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* foram adquiridos e testados em eletroforese em gel de agarose, apresentado integridade suficiente para que os ensaios prosseguissem.

4.1.2.1 Quantificação de bactérias utilizando *primers* específicos

As bactérias *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* *coccoides*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp, bactéria filamentosa segmentada (SFB) e bactéria universal foram identificadas com amplificação de *primers* específicos.

Para análise quantitativa relativa foi utilizado o método C_T comparativo, tendo bactéria universal (delta C_T) e grupo controle *wild type* saudável (delta-delta C_T) como gene referência. Os resultados foram expressos em ordem de grandeza *fold-change*.

As bactérias *Bifidobacterium* spp, *Clostridium coccoides*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus* spp e SFB não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos estudados (gráfico 2A-F).

Notavelmente, os grupos submetidos à sepse experimental tiveram aumento significativo de *Escherichia coli* para *wild type* e CRAMP KO comparados aos seus grupos controles (gráfico 2G).

Gráfico 2 – Abundância de bactérias relativa à abundância de bactéria universal. Foram analisadas as bactérias *Bifidobacterium* spp (A), *Clostridium coccoides* (B), *Enterococcus faecalis* (C), *Enterococcus faecium* (D), *Lactobacillus* spp (E), bactéria filamentosa segmentada (F) e *Escherichia coli* (G), em amostras fecais dos grupos de camundongos: *wild type* controle (WT C), *wild type* em sepse (WT CLP), CRAMP KO controle (KO C) e CRAMP KO em sepse (KO CLP).

F

*bactéria filamentosa segmentada

G

4.2 Identificação de peptídeos antimicrobianos em tecidos

Na padronização de RNA em reação em cadeia de polimerase (PCR), foram analisadas quatro amostras de cada órgão (cólon ascendente, córtex cerebral, íleo terminal e pulmão) e leucócitos. A expressão de β -defensina 1 foi observada no íleo terminal e no pulmão nos quatros grupos estudados. O ensaio de α -defensina 5 foi realizado somente no íleo terminal, sendo observada em todos os grupos. O teste com β -defensina 2 e 3 não revelou expressão em nenhum dos tecidos e leucócitos. Com intuito de encontrar um

controle positivo para β -defensina 2 e 3, duas amostras de RNA purificado de fígado de camundongos *wild type* foram analisadas em PCR, porém apresentou resultado negativo.

Na migração em gel de agarose, a presença de β -defensina 1 foi observada nas amostras de RNA de íleo terminal e de pulmão, bem como α -defensina 5 no íleo terminal nos quatro grupos estudados.

4.2.1 Análise estatística da expressão de α -defensina 5 e β -defensina 1

A análise quantitativa dos peptídeos antimicrobianos (AMPs) foi realizada através do método C_T comparativo, tendo como gene endógeno HPRT1 (delta C_T) e grupo controle *wild type* saudável (delta-delta C_T). Os resultados foram expressos em ordem de grandeza *fold-change*.

A α -defensina 5 teve expressão no cólon ascendente e íleo terminal de todos os grupos estudados, com diminuição estatisticamente significativa no íleo (gráfico 3b) para os grupos WT CLP e KO CLP ao serem comparados com seus respectivos grupos controles (WT C e KO C), assim como no cólon no grupo WT CLP em relação ao WT C (gráfico 3a). Notou-se uma reduzida expressão de α -defensina 5 no cólon no grupo KO C quando comparado ao grupo WT C (gráfico 3a).

No íleo terminal e pulmão, observou-se aumento estatisticamente significativo de β -defensina 1 nos grupos WT CLP e KO CLP em relação aos grupos WT C e KO C, respectivamente (gráfico 3c-d). A β -defensina 1 teve uma maior expressão no grupo WT CLP quando comparado ao KO CLP, no íleo (gráfico 3c), enquanto no grupo WT C apresentou maior expressão em relação ao KO C no pulmão (gráfico 3d).

Gráfico 3 – Expressão gênica de α -defensinas 5 e β -defensina 1 relativa à expressão do gene de referência HPRT1. Foram analisados α -defensina 5 em cólon ascendente (a) e íleo terminal (b) e β -defensina 1 em íleo terminal (c) e pulmão (d). KO C, CRAMP KO controle; KO CLP, CRAMP KO submetido à sepse experimental; WT C, *wild type* controle; WT CLP, *wild type* submetido à sepse experimental.

(a)

(b)

4.3 Análise de dados de defensinas e citocinas

Com intuito de mensurar a produção de moléculas ligadas a respostas inflamatórias, defensinas e citocinas foram analisados no íleo terminal e pulmão. Os grupos estudados foram: *wild type* controle (WT C), *wild type* submetido à sepse experimental (WT CLP), CRAMP KO controle (KO C) e CRAMP KO submetido à sepse experimental (KO CLP).

4.3.1 Análise estatística de liberação de defensinas α -7 e β -1

Os grupos estudados apresentaram semelhança estatística para liberação de α -defensina 7 e β -defensina 1 (gráfico 4a-b) no íleo.

Gráfico 4 – Concentração de α -defensina 7 e β - defensina 1 relativa à quantidade total de proteínas em íleo terminal. As defensinas α -7 (a) e β -1 (b) foram analisados por imunoenensaio em tecidos do íleo terminal de camundongos saudáveis e submetidos à sepse experimental. Os grupos estudados foram: KO C, CRAMP KO controle; KO CLP, CRAMP KO submetido à sepse experimental; WT C, *wild type* controle; WT CLP, *wild type* submetido à sepse experimental.

No pulmão, α -defensina 7 teve aumento significativo no grupo WT CLP quando comparado ao WT C (gráfico 5A). A β -defensina 1 mostrou-se semelhante estatisticamente nos quatro grupos analisados (gráfico 5B).

Gráfico 5 – Concentração de α -defensina 7 e β -defensina 1 relativa à quantidade total de proteínas no pulmão. As defensinas α -7 (A) e β -1 (B) foram analisados por imunoenensaio em tecidos do pulmão de camundongos saudáveis e submetidos à sepse experimental. Os grupos estudados foram: KO C, CRAMP KO controle; KO CLP, CRAMP KO submetido à sepse experimental; WT C, *wild type* controle; WT CLP, *wild type* submetido à sepse experimental.

4.3.2 Análise estatística da liberação de citocinas

A partir de dados obtidos de íleo terminal e pulmão dos camundongos, as citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10, MCP-1 e TNF- α foram analisadas estatisticamente.

Em íleo terminal, a IL-1 β mostrou aumento significativo no grupo KO CLP em relação ao KO C, bem como no grupo WT C comparado ao KO C (gráfico 6a).

No gráfico 6b, observa-se o aumento estatisticamente significativo de IL-6 nos grupos WT CLP e KO CLP em comparação aos grupos WT C e KO C, respectivamente. O grupo WT CLP mostrou maior quantidade significativa de IL-6 do que KO CLP.

A liberação de IL-10 teve maior prevalência no grupo WT CLP comparado aos grupos WT C e KO CLP (gráfico 6c).

Assim como a IL-6, o MCP-1 apresentou aumento significativo nos grupos WT CLP e KO CLP comparados aos seus grupos controles, sendo que WT CLP teve aumento significativo superior ao KO CLP (gráfico 6d).

Os grupos WT CLP e KO CLP apresentaram quantidades de TNF- α aumentadas significativamente em relação aos grupos WT C e KO C, respectivamente (gráfico 6e).

Gráfico 6 – Concentração de citocinas relativa à quantidade total de proteínas em íleo terminal. Os citocinas IL-1 β (a), IL-6 (b), IL-10 (c), MCP-1 (d) e TNF- α (e) foram analisados por imunoensaio em tecidos do íleo terminal de camundongos saudáveis e submetidos à sepse experimental. Os grupos analisados foram: KO C, CRAMP KO controle; KO CLP, CRAMP KO submetido à sepse experimental; WT C, *wild type* controle; WT CLP, *wild type* submetido à sepse experimental.

No pulmão, as citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 e MCP-1 apresentaram aumento significativo nos grupos WT CLP e KO CLP comparados aos seus grupos controles, sendo que o WT CLP teve maior liberação dessas citocinas em relação ao KO CLP (gráfico 7A-D).

Em semelhança ao íleo, a liberação de TNF- α no pulmão foi superior estatisticamente nos grupos WT CLP e KO CLP confrontados aos seus respectivos grupos controles (gráfico 7E).

Gráfico 7 – Concentração de citocinas relativa à quantidade total de proteínas em pulmão. Os citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-10 (C), MCP-1 (D) e TNF- α (E) foram analisados por imunoenensaio em tecidos de pulmão de camundongos saudáveis e submetidos à sepse experimental. Os grupos analisados foram: KO C, CRAMP KO controle; KO CLP, CRAMP KO submetido à sepse experimental; WT C, *wild type* controle; WT CLP, *wild type* submetido à sepse experimental.

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve por premissa a identificação de bactérias com potencial participação em estados de sepse severa. A qualificação e a quantificação bacteriana foram realizadas por análises de DNA em amostras fecais por meio de reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

Comparando as espécies catalogadas na Coleção de Microrganismos e Culturas Celulares DSMZ-Germania do Instituto Leibniz,⁽¹¹⁰⁾ isoladas de intestino de camundongos, percebeu-se que no *QIAmp DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) apenas quatro espécies coincidiram, sendo elas: *Akkermansia muciniphila*, *Anaerotruncus colihominis*, *Bacteroides vulgatus* e *Escherichia coli*. Observou-se ainda que *Alistipes* spp consta na coleção enquanto *Alistipes putredinis* no kit.

Akkermansia muciniphila, *Bacteroides vulgatus* e o agrupamento de espécies *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* foram amplificados e detectados, contrariamente às demais espécies do kit, inclusive *Anaerotruncus colihominis* e *Alistipes putredinis*, que não foram identificadas.

As espécies estudadas a partir de *primers* desenhados para *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* encontram-se catalogadas na mesma coleção, enquanto *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp são representadas por cepas específicas. *Clostridium coccoides* não faz parte do catálogo, porém encontra-se *Clostridium* spp. *Enterococcus faecium* e bactéria filamentosa segmentada (SFB) não fazem parte da coleção alemã.

Akkermansia muciniphila é uma das duas espécies conhecidas do filo Verrucomicrobia e pode ser encontrada em amostras fecais de indivíduos de diferentes idades, sendo sugerida como participante do microbioma intestinal saudável.⁽¹¹¹⁾ A redução na abundância de *A. muciniphila* está associada a doenças, como doença de Crohn, autismo e obesidade e, sua importância para saúde tem sido reportada em vários estudos.^(19, 112-116) A identificação de *A. muciniphila* em intestino de camundongos foi realizada em pesquisas e meta-

análise.^(27, 28) Na literatura, não encontramos relatos de *A. muciniphila* relacionada à sepse ou CRAMP.

As bactérias Gram-negativas *Bacteroides vulgatus* pertencem ao gênero *Bacteroides*, família *Bacteroidaceae* e filo *Bacteroidetes*, o qual é comumente encontrado no trato gastrointestinal (TGI) humano e considerado o mais estável no ecossistema em adultos saudáveis.⁽¹⁹⁾ *B. vulgatus* mostrou-se ser capaz de adaptar-se ao ambiente com a diversificação de seu genoma, contribuindo com sua preservação e equilíbrio intestinal.⁽¹¹⁷⁾ Na prevenção de reações patológicas do sistema imunológico do hospedeiro, *B. vulgatus* parece participar da via de regulação da catepsina S.⁽¹¹⁸⁾ Em contraste, a prevalência fecal de *B. vulgatus* tem sido associada à obesidade e diabetes tipo 1 e 2.⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾ Em artigos, não foram encontradas menções de sepse ou CRAMP associados à espécie *B. vulgatus*. Notavelmente, a maior abundância de *B. vulgatus*, encontrada nos grupos *wild type* controle e em sepse experimental no presente estudo, sugere que exista relação positiva entre o CRAMP e a bactéria, favorecendo a proliferação da mesma, enquanto a sepse parece não impactar no seu crescimento.

O filo *Proteobacteria*, bactérias Gram-negativas, é diverso no TGI, porém pouco abundante, representando apenas 1% da microbiota total. Sendo dividido em cinco classes e entre elas a *Gammaproteobacteria* que inclui a família *Enterobacteriaceae*, com maior prevalência e riqueza.⁽¹⁹⁾ Representantes da *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*) sofreram aumento significativo no grupo selvagem em sepse em relação ao grupo controle. O CRAMP parece não inibir a proliferação acentuada das espécies analisadas em conjunto durante a sepse.

Escherichia coli é uma bactéria anaeróbio-facultativa, encontrada em sangue de pacientes com sepse, sendo associada a eventos ligados à sepse, como disfunção endotelial e ativação do sistema complemento e complexo complemento terminal.^(19, 122-124) No ensaio com *primers*, a comparação entre os grupos estudados mostrou que a sepse experimental possui papel importante na proliferação de *E. coli*, enquanto CRAMP parece ser imparcial na abundância dessa espécie. Testes realizados em condições próximas às

fisiológicas mostraram reduzida atividade antimicrobiana do CRAMP contra *E. coli*.⁽¹²⁵⁾

Os enterococos são patógenos oportunistas associados a infecções graves, como endocardite e bacteremia.⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾ *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são bactérias Gram-positivas, residentes no TGI. *E. faecalis* apresenta prevalência superior em infecções enterocócicas comparada *E. faecium*, enquanto a maior resistência aos antibióticos é designada à *E. faecium*.⁽¹²⁹⁾ *E. faecalis* é comumente encontrada em cultura de urina e sangue em quadros de sepse.^(130, 131) *E. faecium* foi associada à sepse severa em decorrência de traumas.⁽¹³²⁾ O certificado de análise do Invitrogen, fornecedor dos *primers*, trouxe o mesmo desenho para os *primers* de *E. faecalis* e *E. faecium*, deixando em dúvida qual seria a espécie correta.

Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são representados por uma gama de bactérias Gram-positivas comensais, estudados em nutrição funcional, recebendo como atribuição atividade imunomodulatória e participação na homeostase intestinal.⁽¹³³⁻¹³⁵⁾ Estudo com administração, via oral, de *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Bifidobacterium longum* mostrou atenuação da resposta inflamatória em camundongos submetidos à sepse experimental, modulando mediadores inflamatórios, incluindo a redução de IL-6 e TNF- α .⁽¹³⁶⁾

Clostridium coccoides é uma bactéria estritamente anaeróbica e a espécie mais abundante no intestino humano, com atividades relacionadas à imunidade, nutrição, sensibilidade à insulina e saúde do hospedeiro.^(137, 138)

Bactéria filamentosa segmentada (SFB) foi encontrada em baixa abundância em fluídos intestinais, sendo associada à imunidade do hospedeiro.^(139, 140)

A semelhança estatística encontrada entre os grupos estudados para espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Clostridium coccoides* e SFB sugere a ausência de relação entre essas bactérias e a sepse experimental ou CRAMP, nas condições desse estudo.

A deficiência de CRAMP modificou a microbiota intestinal de camundongos, especialmente com presença de bactérias típicas da microbiota oral nas fezes. Gerações posteriores heterozigotas ou selvagens tiveram

microbiotas distanciadas de seus ancestrais CRAMP KO. Esses achados comprovam a importância do CRAMP no equilíbrio intestinal.⁽¹⁴¹⁾

A expressão de β -defensina 1 foi analisada por RT-qPCR e imunofluorescência. A avaliação de α -defensina 5 ocorreu por RT-qPCR e de α -defensina 7 por imunofluorescência.

A deficiência de CRAMP impactou negativamente na expressão de α -defensina 5 no cólon ascendente dos camundongos saudáveis, mantendo a semelhança entre os grupos *knock-out*. Esse achado mostra a importância do CRAMP para expressão de α -defensina 5 no cólon. A sepse experimental causou a inibição da expressão de α -defensina 5, no íleo terminal, para os grupos selvagem e *knock-out* e, no cólon ascendente, apenas para o grupo selvagem.

Os resultados observados no íleo terminal e no pulmão sugerem influência positiva da sepse experimental sobre a expressão de β -defensina 1, enquanto a importância do CRAMP é revelada mediante expressão superior nos animais selvagens em sepse em relação ao *knock-out* em sepse, no íleo, ou ainda, no grupo selvagem saudável comparado ao *knock-out* saudável, no pulmão. Apesar das diferenças encontradas na expressão da β -defensina 1, manteve-se semelhança entre a produção nos grupos, podendo talvez ser explicado pelo intervalo de tempo entre a expressão e a liberação. Em contraste, pacientes pós-queimadura e em sepse apresentaram redução de níveis de proteínas urinárias de β -defensina 1 e 2.⁽¹³¹⁾

O imunoensaio de α -defensina 7 revelou semelhança entre os grupos no íleo terminal, enquanto o grupo selvagem teve aumento significativo em sepse experimental em relação ao selvagem saudável, no pulmão, validando a importância do CRAMP na defesa inata.

Durante a sepse por bactéria gram-negativa, endotoxinas estimulam uma resposta inflamatória sistêmica, desencadeando uma série de eventos fisiopatológicos, como a produção de citocinas pró-inflamatórias, hipotensão, coagulação intravascular e choque séptico.⁽¹⁴²⁻¹⁴⁴⁾ A concentração de citocinas tem sido associada a bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas encontradas em sepse.⁽¹⁴⁵⁾

Aqui, a inflamação tecidual foi avaliada através dos mediadores inflamatórios interleucina 1β (IL- 1β), IL-6 e IL-10, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

A concentração de IL- 1β teve aumento significativo mediante sepse em animais selvagens e deficientes em CRAMP no pulmão, ao passo que no íleo terminal apenas os camundongos deficientes tiveram elevação da interleucina. A presença do CRAMP tem destaque na produção da IL- 1β , podendo ser notado na menor concentração no grupo CRAMP KO em sepse no pulmão, ou ainda, no grupo deficiente em CRAMP saudável no íleo, em relação ao grupo selvagem em sepse e controle, respectivamente.

A IL-6 e o MCP-1 apresentaram o mesmo perfil de liberação tanto no íleo quanto no pulmão, com aumento significativo nos grupos selvagem e deficiente em CRAMP mediante sepse. Novamente, a importância do CRAMP foi evidenciada com a maior produção de IL-6 e MCP-1 em animais selvagens comparados ao grupo deficiente em CRAMP, ambos em sepse.

A concentração de IL-10 foi acrescida em animais selvagens e deficientes em CRAMP em sepse experimental, no pulmão, entretanto, o aumento foi percebido apenas no grupo selvagem em sepse no íleo. Notou-se concentração superior de IL-10 em camundongos selvagens em relação aos CRAMP KO, ambos em sepse, realçando o papel do CRAMP na resposta anti-inflamatória.

O TNF- α apresentou maior concentração nos grupos submetidos à sepse, selvagem e deficiente em CRAMP, em relação aos respectivos grupos controles, no íleo e no pulmão. O CRAMP parece não impactar na liberação de TNF- α durante a sepse experimental.

O aumento das citocinas pró-inflamatórias (IL- 1β , IL-6, MCP-1 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) mediante a sepse está consoante a outros estudos.^(146, 147) A reduzida produção das citocinas IL- 1β , IL-6, IL-10 e MCP-1 durante a sepse nos animais deficientes em CRAMP, enfatiza o importante papel do CRAMP na indução de repostas inflamatórias. Em contraste, estudo mostrou expressiva produção de citocinas pró-inflamatórias e redução das anti-inflamatórias em células gliais com deficiência de CRAMP.⁽¹⁴⁸⁾

Limitações foram observadas no decorrer dos ensaios, tais como o clima frio nos meses de inverno, período de realização das cirurgias e coletas, que impactou na recuperação dos animais, principalmente, nas gaiolas individuais metabólicas somente cobertas com um plástico nas noites frias. Como esperado em sepse experimental, no curto período de sobrevivência de 24 horas, os animais apresentaram afagia e acoproquia, ou ainda, exacerbação da resposta inflamatória, com caracterização comportamental de pelo eriçado, pouca mobilidade e anúria. A redução das fezes a um ou dois *pellets* pode ter implicado em pouca diversidade ou abundância bacteriana, o que poderia ser ajustado com um período maior de sobrevivência em sepse experimental leve ou moderada, com redução de calibre da agulha ou limitação a um furo na porção distal do ceco durante a CLP.

Outra limitação do estudo remete aos restritos recursos de variáveis experimentais, como isenção de DNA residuais nas gaiolas metabólicas ou ambientais, com risco de contaminação das amostras. Assegurar resultados fidedignos é de real importância quando técnicas de sequenciamento de DNA são utilizadas. Considerável diversidade de microrganismos e células contaminantes tem sido relatada em reagentes e *kits* comerciais.⁽¹⁴⁹⁾ A fim de minimizar possíveis contaminantes, durante os ensaios, as boas práticas de limpeza, esterilização e manuseio foram seguidas.

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo, concluiu-se que a sepse modifica positivamente a abundância intestinal da bactéria *Escherichia coli*. Em disbiose intestinal, o CRAMP participa ativamente da resposta inflamatória, mediante produção de citocinas no pulmão e íleo terminal, e ainda, parece estar associado à abundância da espécie *Bacteroides vulgatus*. Futuros estudos poderão aprofundar o tênue conhecimento sobre a interação entre sepse e o microbioma intestinal.

ANEXO

ANEXO – Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL EM MODELO MURINO DE SEPSE**”, registrada com o nº 055/17, sob a responsabilidade de **Fabiano Pinheiro da Silva e Marta Lucia de Almeida**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 11.05.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 03-06-2017 Término: 03-06-2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	50
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	macho
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 11 de Maio de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

REFERÊNCIAS*

1. Collen A. *10% Humano*. Tradução de Ivo Korytowski. Rio de Janeiro: Sextante; 2016. Cap. 5, p. 151-180: A guerra dos germes.
2. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010;74(3):417-33.
3. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïs CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17(4):219-32.
4. Kinross JM, Darzi AW, Nicholson JK. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Medicine*. 2011;3:12.
5. Spencer SP, Wilhelm C, Yang Q, Hall JA, Bouladoux N, Boyd A, et al. Adaptation of Innate Lymphoid Cells to a Micronutrient Deficiency Promotes Type 2 Barrier Immunity. *Science*. 2014;343(6169):432-7.
6. Nakatsuji T, Gallo RL. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012;132(3):887-95.
7. Yu GZ, Baeder DY, Regoes RR, Rolff J. Predicting drug resistance evolution: insights from antimicrobial peptides and antibiotics. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2018;285(1874):9.
8. Florescu DF, Sandkovsky U, Kalil AC. Sepsis and Challenging Infections in the Immunosuppressed Patient in the Intensive Care Unit. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2017;31(3):415-34.
9. Mohseny AB, van Velze V, Steggerda SJ, Smits-Wintjens V, Bekker V, Lopriore E. Late-onset sepsis due to urinary tract infection in very preterm neonates is not uncommon. *European Journal of Pediatrics*. 2018;177(1):33-8.

* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

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

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

10. Pandya A, Chaput KH, Schertzer A, Moser D, Guilfoyle J, MacGillivray S, et al. Risk of Infection and Sepsis in Pediatric Patients with Traumatic Brain Injury Admitted to Hospital Following Major Trauma. *Scientific Reports*. 2018;8:6.
11. Bleszynski MS, Chan T, Buczkowski AK. Comparison of inflammatory cytokines in peritoneal fluid at source control surgery for abdominal sepsis. *American Journal of Surgery*. 2017;213(5):849-55.
12. Collen A. *10% Humano*. Tradução de Ivo Korytowski. Rio de Janeiro: Sextante; 2016. Introdução, p. 17-33: Os outros 90%.
13. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Medicine*. 2016;8:11.
14. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
15. Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-Targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998;64(9):3336-45.
16. Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrie E, Flint HJ. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *Fems Microbiology Ecology*. 2002;39(1):33-9.
17. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65(11):4799-807.
18. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-8.
19. Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *Fems Microbiology Reviews*. 2014;38(5):996-1047.

20. Tanca A, Abbondio M, Palomba A, Fraumene C, Manghina V, Cucca F, et al. Potential and active functions in the gut microbiota of a healthy human cohort. *Microbiome*. 2017;5:15.
21. O'Connor EM, O'Herlihy EA, O'Toole PW. Gut microbiota in older subjects: variation, health consequences and dietary intervention prospects. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2014;73(4):441-51.
22. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota. *Science*. 2013;341(6141):44-+.
23. Biagi E, Quercia S, Aceti A, Beghetti I, Rampelli S, Turrone S, et al. The Bacterial Ecosystem of Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:9.
24. Rosado MM, Aranburu A, Scarsella M, Cascioli S, Giorda E, Del Chierico F, et al. Spleen development is modulated by neonatal gut microbiota. *Immunology Letters*. 2018;199:1-15.
25. Flynn KJ, Ruffin MT, Turgeon DK, Schloss PD. Spatial Variation of the Native Colon Microbiota in Healthy Adults. *Cancer Prevention Research*. 2018;11(7):393-401.
26. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:4586-91.
27. Krych L, Hansen CHF, Hansen AK, van den Berg FWJ, Nielsen DS. Quantitatively Different, yet Qualitatively Alike: A Meta-Analysis of the Mouse Core Gut Microbiome with a View towards the Human Gut Microbiome. *Plos One*. 2013;8(5):11.
28. Lagkouravdos I, Pukall R, Abt B, Foesel BU, Meier-Kolthoff JP, Kumar N, et al. The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. *Nature Microbiology*. 2016;1(10).
29. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 8a ed. São Paulo: Elsevier. Cap. 14, p. 289-313: Imunidade especializada em barreiras epiteliais e em tecidos imunologicamente privilegiados.

30. Fay KT, Ford ML, Coopersmith CM. The intestinal microenvironment in sepsis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2017;1863(10):2574-83.
31. Klingensmith NJ, Coopersmith CM. The Gut as the Motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness. *Critical Care Clinics*. 2016;32(2):203-212.
32. Clevers HC, Bevins CL. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. In: Julius D, editor. *Annual Review of Physiology*, Vol 75. Annual Review of Physiology. 75. Palo Alto: Annual Reviews; 2013. p. 289-311.
33. Heida FH, Beyduz G, Bulthuis MLC, Kooi EMW, Bos AF, Timmer A, et al. Paneth cells in the developing gut: when do they arise and when are they immune competent? *Pediatric Research*. 2016;80(2):306-10.
34. Nagashima K, Sawa S, Nitta T, Tsutsumi M, Okamura T, Penninger JM, et al. Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nature Immunology*. 2017;18(6):675-82.
35. Earley ZM, Akhtar S, Green SJ, Naqib A, Khan O, Cannon AR, et al. Burn Injury Alters the Intestinal Microbiome and Increases Gut Permeability and Bacterial Translocation. *Plos One*. 2015;10(7):16.
36. Ahern PP, Faith JJ, Gordon JI. Mining the Human Gut Microbiota for Effector Strains that Shape the Immune System. *Immunity*. 2014;40(6):815-23.
37. Nie Q, Hu J, Gao H, Fan L, Chen H, Nie S. Polysaccharide from *Plantago asiatica* L. attenuates hyperglycemia, hyperlipidemia and affects colon microbiota in type 2 diabetic rats. *Food Hydrocolloids*. 2019;86:34-42.
38. Kurakawa T, Ogata K, Matsuda K, Tsuji H, Kubota H, Takada T, et al. Diversity of Intestinal *Clostridium coccoides* Group in the Japanese Population, as Demonstrated by Reverse Transcription-Quantitative PCR (vol 10, e0126226, 2015). *Plos One*. 2016;11(3):3.
39. Lecuyer E, Rakotobe S, Lengline-Garnier H, Lebreton C, Picard M, Juste C, et al. Segmented Filamentous Bacterium Uses Secondary and Tertiary Lymphoid Tissues to Induce Gut IgA and Specific T Helper 17 Cell Responses. *Immunity*. 2014;40(4):608-20.

40. Haynes BF, Soderberg KA, Fauci AS. *Harrison's principles of internal medicine* [Internet]. 19th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2014. 372e, Introduction to the immune system. [cited 2018 set 18]. Available from: <https://accessmedicine.mhmedical.com/Content.aspx?bookId=1130§ionId=79749406>.
41. Hirota K, Turner JE, Villa M, Duarte JH, Demengeot J, Steinmetz OM, et al. Plasticity of T(H)17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nature Immunology*. 2013;14(4):372-9.
42. Kim SH, Kim YN, Jang YS. Cutting Edge: LL-37-Mediated Formyl Peptide Receptor-2 Signaling in Follicular Dendritic Cells Contributes to B Cell Activation in Peyer's Patch Germinal Centers. *Journal of Immunology*. 2017;198(2):629-33.
43. Dupont A, Heinbockel L, Brandenburg K, Hornef MW. Antimicrobial peptides and the enteric mucus layer act in concert to protect the intestinal mucosa. *Gut Microbes*. 2014;5(6):761-5.
44. Antoni L, Nuding S, Weller D, Gerseemann M, Ott G, Wehkamp J, et al. Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides. *J Crohns Colitis*. 2013;7(12):e652-64.
45. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual Review of Immunology*. 2004;22:181-215.
46. Agier J, Rozalska S, Wiktorska M, Zelechowska P, Pastwinska J, Brzezinska-Blaszczyk E. The RLR/NLR expression and pro-inflammatory activity of tissue mast cells are regulated by cathelicidin LL-37 and defensin hBD-2. *Scientific Reports*. 2018;8:16.
47. Silva FP, Machado MCC. The dual role of cathelicidins in systemic inflammation. *Immunology Letters*. 2017;182:57-60.
48. Alalwani SM, Sierigk J, Herr C, Pinkenburg O, Gallo R, Vogelmeier C, et al. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *European Journal of Immunology*. 2010;40(4):1118-26.

49. Lyons JD, Ford ML, Coopersmith CM. The Microbiome in Critical Illness: Firm Conclusions or Bact to Square One? Digestive Diseases and Sciences. 2016;61(6):1420-1.
50. Rakoff-Nahoum S, Foster KR, Comstock LE. The evolution of cooperation within the gut microbiota. Nature. 2016;533(7602):255-59.
51. Crouzet L, Derrien M, Cherbuy C, Plancade S, Foulon M, Chalin B, et al. *Lactobacillus paracasei* CNCM I-3689 reduces vancomycin-resistant *Enterococcus* persistence and promotes *Bacteroidetes* resilience in the gut following antibiotic challenge. Scientific Reports. 2018;8:11.
52. Lankelma JM, Birnie E, Weehuizen TAF, Scicluna BP, Belzer C, Houtkooper RH, et al. The gut microbiota as a modulator of innate immunity during melioidosis. Plos Neglected Tropical Diseases. 2017;11(4):18.
53. Zeng MY, Cisalpino D, Varadarajan S, Hellman J, Warren HS, Cascalho M, et al. Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens. Immunity. 2016;44(3):647-58.
54. Fransen F, van Beek AA, Borghuis T, Meijer B, Hugenholtz F, Jongh C, et al. The Impact of Gut Microbiota on Gender-Specific Differences in Immunity. Frontiers in Immunology. 2017;8:14.
55. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. Science. 2015;350(6264):1084-9.
56. Maerz JK, Steimle A, Lange A, Bender A, Fehrenbacher B, Frick JS. Outer membrane vesicles blebbing contributes to *B. vulgatus* mpk-mediated immune response silencing. Gut Microbes. 2018;9(1):1-12.
57. Loohuis LMO, Mangul S, Ori APS, Jospin G, Koslicki D, Yang HT, et al. Transcriptome analysis in whole blood reveals increased microbial diversity in schizophrenia. Translational Psychiatry. 2018;8:9.
58. Ruiz L, Espinosa-Martos I, Garcia-Carral C, Manzano S, McGuire MK, Meehan CL, et al. What's Normal? Immune Profiling of Human Milk from Healthy Women Living in Different Geographical and Socioeconomic Settings. Frontiers in Immunology. 2017;8:17.

59. He YY, Lawlor NT, Newburg DS. Human Milk Components Modulate Toll-Like Receptor-Mediated Inflammation. *Advances in Nutrition*. 2016;7(1):102-11.
60. Bednarska O, Walter SA, Casado-Bedmar M, Strom M, Salvo-Romero E, Vicario M, et al. Vasoactive Intestinal Polypeptide and Mast Cells Regulate Increased Passage of Colonic Bacteria in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*. 2017;153(4):948-60.
61. Guo SH, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *American Journal of Pathology*. 2013;182(2):375-87.
62. He XL, Zeng Q, Puthiyakunnon S, Zeng ZJ, Yang WJ, Qiu JW, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant enhance neonatal resistance to systemic *Escherichia coli* K1 infection by accelerating development of intestinal defense. *Scientific Reports*. 2017;7:14.
63. Kim CH, Go HJ, Oh HY, Park JB, Lee TK, Seo JK, et al. Identification of a novel antimicrobial peptide from the sea star *Patina pectinifera*. *Developmental and Comparative Immunology*. 2018;86:203-13.
64. Fialho TL, Carrijo LC, Magalhaes MJ, Baracat-Pereira MC, Piccoli RH, de Abreu LR. Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. *Food Research International*. 2018;107:406-13.
65. Gaglione R, Pirone L, Farina B, Fusco S, Smaldone G, Aulitto M, et al. Insights into the anticancer properties of the first antimicrobial peptide from Archaea. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. 2017;1861(9):2155-64.
66. Song DG, Zong X, Zhang HW, Wang TH, Yi HB, Luan C, et al. Antimicrobial peptide Cathelicidin-BF prevents intestinal barrier dysfunction in a mouse model of endotoxemia. *International Immunopharmacology*. 2015;25(1):141-7.
67. Starr CG, Maderdrut JL, He J, Coy DH, Wimley WC. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent broad-spectrum antimicrobial peptide: Structure-activity relationships. *Peptides*. 2018;104:35-40.

68. Kubicek-Sutherland JZ, Lofton H, Vestergaard M, Hjort K, Ingmer H, Andersson DI. Antimicrobial peptide exposure selects for *Staphylococcus aureus* resistance to human defence peptides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(1):115-27.
69. Hollmanna A, Martinez M, Noguera ME, Augusto MT, Disalvo A, Santos NC, et al. Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide-membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2016;141:528-36.
70. Maturana P, Martinez M, Noguera ME, Santos NC, Disalva EA, Semorile L, et al. Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: Implication on antimicrobial and hemolytic activity. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2017;153:152-9.
71. Souza LMP, Nascimento JB, Romeu AL, Estrada-Lopez ED, Pimentel AS. Penetration of antimicrobial peptides in a lung surfactant model. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2018;167:345-53.
72. Sousa FH, Casanova V, Findlay F, Stevens C, Svoboda P, Pohl J, et al. Cathelicidins display conserved direct antiviral activity towards rhinovirus. *Peptides*. 2017;95:76-83.
73. Alam MJ, Rashid MM, Kabir Y, Raqib R, Ahmad SM. On birth single dose live attenuated OPV and BCG vaccination induces gut cathelicidin LL37 responses at 6 week of age: A natural experiment. *Vaccine*. 2015;33(1):18-21.
74. Babolewska E, Brzezinska-Blaszczyk E. Human-derived cathelicidin LL-37 directly activates mast cells to proinflammatory mediator synthesis and migratory response. *Cellular Immunology*. 2015;293(2):67-73.
75. da Silva FP, Medeiros MCR, dos Santos ABG, Ferreira MA, Garippo AL, Chammas R, et al. Neutrophils LL-37 migrate to the nucleus during overwhelming infection. *Tissue & Cell*. 2013;45(5):318-20.
76. Kozłowska E, Wysokiński A, Brzezinska-Blaszczyk E. Serum levels of peptide cathelicidin LL-37 in elderly patients with depression. *Psychiatry Research*. 2017;255:156-60.

77. Sun WY, Zheng Y, Lu ZY, Wang H, Feng ZH, Wang J, et al. LL-37 attenuates inflammatory impairment via mTOR signaling-dependent mitochondrial protection. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;54:26-35.
78. Dilek F, Gultepe B, Ozkaya E, Yazici M, Gedik AH, Cakir E. Beyond anti-microbial properties: The role of cathelicidin in allergic rhinitis. *Allergologia Et Immunopathologia*. 2016;44(4):297-302.
79. Pound LD, Patrick C, Eberhard CE, Mottawea W, Wang GS, Abujamel T, et al. Cathelicidin Antimicrobial Peptide: A Novel Regulator of Islet Function, Islet Regeneration, and Selected Gut Bacteria. *Diabetes*. 2015;64(12):4135-47.
80. Fan D, Coughlin LA, Neubauer MM, Kim J, Kim MS, Zhan XW, et al. Activation of HIF-1 alpha and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization. *Nature Medicine*. 2015;21(7):808-14.
81. Otte JM, Zdebik AE, Brand S, Chromik AM, Strauss S, Schmitz F, et al. Effects of the cathelicidin LL-37 on intestinal epithelial barrier integrity. *Regulatory Peptides*. 2009;156(1-3):104-17.
82. Gupta S, Jackson AR, DaJusta DG, McLeod DJ, Alpert SA, Jayanthi VR, et al. Urinary antimicrobial peptides: Potential novel biomarkers of obstructive uropathy. *Journal of Pediatric Urology*. 2018;14(3):6.
83. Cederlund A, Kai-Larsen Y, Printz G, Yoshio H, Alvelius G, Lagercrantz H, et al. Lactose in Human Breast Milk an Inducer of Innate Immunity with Implications for a Role in Intestinal Homeostasis. *Plos One*. 2013;8(1):12.
84. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012. *Intensive Care Medicine*. 2013;39(2):165-228.
85. ILAS. Sepsis: um problema de saúde pública. Brasília: CFM & ILAS; 2015. 90 p.
86. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2016;315(8):801-10.

87. Cohen J, Vincent JL, Adhikari NKJ, Machado FR, Angus DC, Calandra T, et al. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infectious Diseases*. 2015;15(5):581-614.
88. Gatt M. The role of the gut in sepsis. *Elsevier Surgery*. 2015;33(11):534-41.
89. Liu Y, Hou JH, Li Q, Chen KJ, Wang SN, Wang JM. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Springerplus*. 2016;5:10.
90. Hendry C, Farley A, McLafferty E, Johnstone C. Function of the immune system. *Nurs Stand*. 2013;27(19):35-42.
91. McDonald D, Ackermann G, Khailova L, Baird C, Heyland D, Kozar R, et al. Extreme Dysbiosis of the Microbiome in Critical Illness. *Mosphere*. 2016;1(4):6.
92. Huang CL, Chen J, Wang JJ, Zhou H, Lu YY, Lou LH, et al. Dysbiosis of Intestinal Microbiota and Decreased Antimicrobial Peptide Level in Paneth Cells during Hypertriglyceridemia-Related Acute Necrotizing Pancreatitis in Rats. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:13.
93. Hilbert T, Steinhagen F, Senzig S, Cramer N, Bekeredjian-Ding I, Parcina M, et al. Vendor effects on murine gut microbiota influence experimental abdominal sepsis. *Journal of Surgical Research*. 2017;211:126-36.
94. Dickson RP, Singer BH, Newstead MW, Falkowski NR, Erb-Downward JR, Standiford TJ, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Nature Microbiology*. 2016;1(10):9.
95. Busani S, Serafini G, Mantovani E, Venturelli C, Giannella M, Viale P, et al. Mortality in Patients With Septic Shock by Multidrug Resistant Bacteria: Risk Factors and Impact of Sepsis Treatments. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2017:0885066616688165.
96. Zaborin A, Smith D, Garfield K, Quensen J, Shakhsher B, Kade M, et al. Membership and Behavior of Ultra-Low-Diversity Pathogen Communities Present in the Gut of Humans during Prolonged Critical Illness. *Mbio*. 2014;5(5):14.

97. Li SY, Lv J, Li JG, Zhao ZL, Guo H, Zhang YN, et al. Intestinal microbiota impact sepsis associated encephalopathy via the vagus nerve. *Neuroscience Letters*. 2018;662:98-104.
98. Wei YL, Yang J, Wang J, Yang Y, Huang J, Gong H, et al. Successful treatment with fecal microbiota transplantation in patients with multiple organ dysfunction syndrome and diarrhea following severe sepsis. *Critical Care*. 2016;20:9.
99. Stegmiller NP, Barcelos EC, Leal JM, Covre LP, Donatele DM, Guedes HLD, et al. Intranasal vaccination with adjuvant-free *S. aureus* antigens effectively protects mice against experimental sepsis. *Vaccine*. 2016;34(30):3493-9.
100. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S, et al. Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2015;314(10):1039-51.
101. Furyk JS, Swann O, Molyneux E. Systematic review: neonatal meningitis in the developing world. *Tropical Medicine & International Health*. 2011;16(6):672-9.
102. Hu ZS, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Reich J, Kuwahara-Arai K, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the pyroptosis of macrophages and improves the survival of polybacterial septic mice. *International Immunology*. 2016;28(5):245-53.
103. Trend S, Strunk T, Hibbert J, Kok CH, Zhang GC, Doherty DA, et al. Antimicrobial Protein and Peptide Concentrations and Activity in Human Breast Milk Consumed by Preterm Infants at Risk of Late-Onset Neonatal Sepsis. *Plos One*. 2015;10(2):20.
104. Berkestedt I, Herwald H, Ljunggren L, Nelson A, Bodelsson M. Elevated Plasma Levels of Antimicrobial Polypeptides in Patients with Severe Sepsis. *Journal of Innate Immunity*. 2010;2(5):478-82.
105. Quraishi SA, De Pascale G, Needleman JS, Nakazawa H, Kaneki M, Bajwa EK, et al. Effect of Cholecalciferol Supplementation on Vitamin D Status and Cathelicidin Levels in Sepsis: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Critical Care Medicine*. 2015;43(9):1928-37.

106. Koziel J, Bryzek D, Sroka A, Maresz K, Glowczyk I, Bielecka E, et al. Citrullination Alters Immunomodulatory Function of LL-37 Essential for Prevention of Endotoxin-Induced Sepsis. *Journal of Immunology*. 2014;192(11):5363-72.
107. Qiagen Sample & Assay Technologies. *QIAmp® DNA Stool Handbook*. 2nd ed. June 2012.
108. Qiagen Sample & Assay Technologies. *Microbial DNA qPCR Handbook*. August 2013.
109. Qiagen Sample & Assay Technologies. *Microbial DNA qPCR Array: Metabolic Disorders*. Cat. 330261, Baid-1406ZRA.
110. Leibniz-Institut DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures [Internet]. [cited 2018 set 18]. Available from: <https://www.dsmz.de/catalogues/dzif-sammlung-der-dsmz/maus-mikrobiomliste.html>.
111. Collado MC, Derrien M, Isolauri E. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(23):7767-70.
112. Lopez-Siles M, Enrich-Capo N, Aldeguer X, Sabat-Mir M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, et al. Alterations in the Abundance and Co-occurrence of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018;8:16.
113. Wang L, Christophersen CT, Sorich MJ, Gerber JP, Angley MT, Conlon MA. Low Relative Abundances of the Mucolytic Bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in Feces of Children with Autism. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77(18):6718-21.
114. Schneeberger M, Everard A, Gomez-Valades AG, Matamoros S, Ramirez S, Delzenne NM, et al. *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports*. 2015;5:14.
115. Lukovac S, Belzer C, Pellis L, Keijser BJ, de Vos WM, Montijn RC, et al. Differential Modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium*

- prausnitzii of Host Peripheral Lipid Metabolism and Histone Acetylation in Mouse Gut Organoids. *Mbio*. 2014;5(4):10.
116. Reunanen J, Kainulainen V, Huuskonen L, Ottman N, Belzer C, Huhtinen H, et al. *Akkermansia muciniphila* Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;81(11):3655-62.
 117. Lange A, Beier S, Steimle A, Autenrieth IB, Huson DH, Frick JS. Extensive Mobilome-Driven Genome Diversification in Mouse Gut-Associated *Bacteroides vulgatus* mpk. *Genome Biology and Evolution*. 2016;8(4):1197-207.
 118. Steimle A, Gronbach K, Beifuss B, Schafer A, Harmening R, Bender A, et al. Symbiotic gut commensal bacteria act as host cathepsin S activity regulators. *Journal of Autoimmunity*. 2016;75:82-95.
 119. Ignacio A, Fernandes MR, Rodrigues VAA, Groppo FC, Cardoso AL, Avila-Campos MJ, et al. Correlation between body mass index and faecal microbiota from children. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016;22(3):258.e1-.e8.
 120. Higuchi BS, Rodrigues N, Gonzaga MI, Paiolo JCC, Stefanutto N, Omori WP, et al. Intestinal Dysbiosis in Autoimmune Diabetes Is Correlated With Poor Glycemic Control and Increased interleukin-6: A Pilot Study. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:12.
 121. Leite AZ, Rodrigues ND, Gonzaga MI, Paiolo JCC, de Souza CA, Stefanutto NAV, et al. Detection of Increased Plasma Interleukin-6 Levels and Prevalence of *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus* in the Feces of Type 2 Diabetes Patients. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:12.
 122. Watanabe N, Kryukov K, Nakagawa S, Takeuchi JS, Takeshita M, Kirimura Y, et al. Detection of pathogenic bacteria in the blood from sepsis patients using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis. *Plos One*. 2018;13(8):11.
 123. McHale TM, Garciarena CD, Fagan RP, Smith SGJ, Martin-Loches I, Curley GF, et al. Inhibition of Vascular Endothelial Cell Leak Following *Escherichia coli* Attachment in an Experimental Model of Sepsis. *Critical Care Medicine*. 2018;46(8):E805-E10.

124. Keshari RS, Silasi R, Popescu NI, Patel MM, Chaaban H, Lupu C, et al. Inhibition of complement C5 protects against organ failure and reduces mortality in a baboon model of *Escherichia coli* sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(31):E6390-E9.
125. Coorens M, Scheenstra MR, Veldhuizen EJA, Haagsman HP. Interspecies cathelicidin comparison reveals divergence in antimicrobial activity, TLR modulation, chemokine induction and regulation of phagocytosis. *Scientific Reports*. 2017;7:11.
126. Dahl A, Lauridsen TK, Arpi M, Sorensen LL, Ostergaard C, Sogaard P, et al. Risk Factors of Endocarditis in Patients With *Enterococcus faecalis* Bacteremia: External Validation of the NOVA Score. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(6):771-5.
127. Cardenas AM, Andreacchio KA, Edelstein PH. Prevalence and Detection of Mixed-Population Enterococcal Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(7):2604-8.
128. Raven KE, Gouliouris T, Parkhill J, Peacock SJ. Genome-Based Analysis of *Enterococcus faecium* Bacteremia Associated with Recurrent and Mixed-Strain Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018;56(3):9.
129. Coombs GW, Daley DA, Lee YT, Pang S, Pearson JC, Robinson JO, et al. Australian Group on Antimicrobial Resistance Australian Enterococcal Sepsis Outcome Programme Annual Report, 2014. *Communicable Diseases Intelligence*. 2016;40(2):E236-E43.
130. Hay S, Burchett S, Odejide O, Cataltepe S. Septic Episodes in a Premature Infant After In Utero Exposure to Rituximab. *Pediatrics*. 2017;140(3):5.
131. Plichta JK, Holmes CJ, Nienhouse V, Puszynski M, Gao X, Dong QF, et al. Cutaneous Burn Injury Modulates Urinary Antimicrobial Peptide Responses and the Urinary Microbiome. *Critical Care Medicine*. 2017;45(6):E543-E51.
132. Mutschler M, Trojan S, Defosse JM, Helmers A, Probst C, Bouillon B, et al. Severe sepsis caused by a linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a

- 10-year-old girl after multiple trauma. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013;17(6):E466-E7.
133. Felis GE, Dellaglio F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2007 Sep;8(8):44-61.
 134. Taverniti V, Scabiosi C, Arioli S, Mora D, Guglielmetti S. Short-term daily intake of 6 billion live probiotic cells can be insufficient in healthy adults to modulate the intestinal bifidobacteria and lactobacilli. *Journal of Functional Foods*. 2014;6:482-91.
 135. Luongo D, Coppola A, Treppiccione L, Bergamo P, Sorrentino A, Ferrocino I, et al. Modulation of the cytokine profile in Caco-2 cells by faecal lactobacilli and bifidobacteria from individuals with distinct dietary habits. *Cytokine*. 2017;90:80-7.
 136. Khailova L, Petrie B, Baird CH, Rieg JAD, Wischmeyer PE. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium longum* Attenuate Lung Injury and Inflammatory Response in Experimental Sepsis. *Plos One*. 2014;9(5):9.
 137. Jamar G, Santamarina AB, Dias GC, Masquio DCL, de Rosso VV, Pisani LP. Relationship between fatty acids intake and *Clostridium coccoides* in obese individuals with metabolic syndrome. *Food Research International*. 2018;113:86-92.
 138. Teixeira TFS, Grzeskowiak LM, Salminen S, Laitinen K, Bressan J, Peluzio MDG. Faecal levels of *Bifidobacterium* and *Clostridium coccoides* but not plasma lipopolysaccharide are inversely related to insulin and HOMA index in women. *Clinical Nutrition*. 2013;32(6):1017-22.
 139. Chen B, Chen HH, Shu XL, Yin YS, Li J, Qin JJ, et al. Presence of Segmented Filamentous Bacteria in Human Children and Its Potential Role in the Modulation of Human Gut Immunity. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:11.
 140. Goto Y, Panea C, Nakato G, Cebula A, Lee C, Diez MG, et al. Segmented Filamentous Bacteria Antigens Presented by Intestinal Dendritic Cells Drive Mucosal Th17 Cell Differentiation. *Immunity*. 2014;40(4):594-607.
 141. Yoshimura T, McLean MH, Dzutsev AK, Yao XH, Chen KQ, Huang JQ, et al. The Antimicrobial Peptide CRAMP Is Essential for Colon Homeostasis

- by Maintaining Microbiota Balance. *Journal of Immunology*. 2018;200(6):2174-85.
142. Yaroustovsky M, Plyushch M, Popov D, Samsonova N, Abramyan M, Popok Z, et al. Prognostic value of endotoxin activity assay in patients with severe sepsis after cardiac surgery. *Journal of Inflammation-London*. 2013;10:5.
 143. Thamphiwatana S, Angsantikul P, Escajadillo T, Zhang QZ, Olson J, Luk BT, et al. Macrophage-like nanoparticles concurrently absorbing endotoxins and proinflammatory cytokines for sepsis management. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(43):11488-93.
 144. Walborn A, Hoppensteadt D, Syed D, Mosier M, Fareed J. Biomarker Profile of Sepsis-Associated Coagulopathy Using Biochip Assay for Inflammatory Cytokines. *Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis*. 2018;24(4):625-32.
 145. Surbatovic M, Popovic N, Vojvodic D, Milosevic I, Acimovic G, Stojicic M, et al. Cytokine Profile in Severe Gram-Positive and Gram-Negative Abdominal Sepsis. *Scientific Reports*. 2015;5:12.
 146. Khaertynov KS, Boichuk SV, Khaiboullina SF, Anokhin VA, Andreeva AA, Lombardi VC, et al. Comparative Assessment of Cytokine Pattern in Early and Late Onset of Neonatal Sepsis. *Journal of Immunology Research*. 2017:8.
 147. Lingaraju MC, Pathak NN, Begum J, Balaganur V, Bhat RA, Ramachandra HD, et al. Betulinic acid attenuates lung injury by modulation of inflammatory cytokine response in experimentally-induced polymicrobial sepsis in mice. *Cytokine*. 2015;71(1):101-8.
 148. Kress E, Merres J, Albrecht LJ, Hammerschmidt S, Pufe T, Tauber SC, et al. CRAMP deficiency leads to a proinflammatory phenotype and impaired phagocytosis after exposure to bacterial meningitis pathogens. *Cell Communication and Signaling*. 2017;15:15.
 149. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *Bmc Biology*. 2014;12:12.