FABIANO PINHEIRO DA SILVA

**CHOQUE SÉPTICO: INTEGRANDO IMUNOLOGIA E BIOLOGIA DE
SISTEMAS**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Professor
Livre-docente junto ao Departamento de
Clínica Médica (Disciplina de
Emergências Clínicas)

SÃO PAULO

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Fabiano Pinheiro da

Choque séptico : integrando imunologia e biologia de sistemas / Fabiano Pinheiro da Silva. -- São Paulo, 2014.

**Tese(livre-docência)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Departamento de Clínica Médica. Disciplina de Emergências Clínicas.

Descritores: 1.Choque séptico 2.Sepse 3.Inflamação 4.Peptídeos catiônicos antimicrobianos 5.Receptores Fc

Fabiano Pinheiro da Silva

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Disciplina de Emergências Clínicas

Laboratório de Investigações Médicas (LIM-51)

À minha mãe, Enide

The only journey is the one within.

Rainer Maria Rilke

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. **Irineu Tadeu Velasco**, Professor Titular do Departamento de Emergências Clínicas da Universidade de São Paulo, pelo incentivo e entusiasmo constantes destinados à Pesquisa. Agradeço pelo apoio dado ao meu trabalho, assim como pelas inúmeras lições de vida.

Ao Prof. Dr. **Renato Costa Monteiro**, pela confiança em meu trabalho, pelas inúmeras discussões científicas, pela amizade e exemplo como pesquisador.

Ao Prof. Dr. **Heraldo Possolo de Souza**, pelo incentivo constante e apoio em todos os aspectos, desde que eu retornei em 2009 dos Estados Unidos e comecei a trabalhar sob sua supervisão. Por ter me dado a grande oportunidade de fazer Pesquisa em Unidades de Terapia Intensiva.

Ao Dr. **Murilo Chiamolera**, por ter me acompanhado desde os primeiros passos da minha carreira, pela sua força de trabalho contagiante, sua amizade, seu entusiasmo, sua inesgotável ajuda e sua enriquecedora presença.

Ao Prof. Dr. **Marcel Cerqueira César Machado**, grande colaborador e companheiro de pesquisa, com quem desenhei a maior parte dos meus projetos nos últimos anos, com quem divido diariamente minhas dúvidas e com quem tenho aprendido tanto.

Ao Prof. Dr. **Francisco Garcia Soriano**, meus sinceros agradecimentos pelo apoio, pela amizade e pelas discussões enriquecedoras sobre a doença que tanto nos intriga.

Aos meus colegas de laboratório, pelo agradável ambiente de trabalho, pela amizade e profissionalismo: **Antônio dos Santos Filho, Denise Frediani Barbeiro, Fátima Bernardes Abatepaulo, Geraldo Gomes Sobrinho, Hermes Vieira Barbeiro, Kelli Cristina Theodoro Gouvea, Marcia Kiyomi Koike, Sheila Serra Vieira Pinto, Suely Kunimi Kubo Ariga e Thais Martins de Lima.**

Aos meus alunos de Mestrado e Doutorado: **Débora Maria Gomes Cunha, Diogo Vieira da Silva Pellegrina, Emerson Renato Martins, Guilherme Tude, Jaqueline Beppler, Mike Yoshio Hamasaki, Neusa Pimentel, Patrícia Orosco Pinto, Renato Wilberto Zilli e Rizia Callou Amaral.**

A todos os meus colegas das Unidades de Terapia Intensiva do Departamento de Emergências Clínicas da Universidade de São Paulo, pela amizade e pelo brilhantismo profissional.

A todos os pesquisadores com quem tive o prazer de compartilhar experimentos e ideias.

Aos pacientes das Unidades de Terapia Intensiva da Disciplina de Emergências Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e aos seus familiares por consentirem em participar deste estudo.

Ao árduo e competente trabalho das minhas colegas **Angélica, Clélia, Eliane, Katia, Maria Cristina e Rose**.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), à **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), ao **CNPq** (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil) e ao **INSERM** (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), pelo incentivo e fomento à Pesquisa.

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

Referências: 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*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo:Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de siglas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1 Introdução

1.1 Breve história da doença.....	1
1.2 Conceitos iniciais.....	7
1.3 Sepsis - Aspectos clínicos-epidemiológicos.....	11
1.4 Imunidade inata.....	17
1.5 Apoptose.....	32

2 Peptídeos antimicrobianos

2.1 Conceitos gerais.....	34
2.2 Vitamina D e imunidade.....	36
2.3 Translocação nuclear de catelicidinas.....	37
2.4 Peptídeos antimicrobianos: aspectos moleculares e evolução.....	39
2.5 Peptídeos antimicrobianos e câncer.....	50

3 Receptores de Fc de Imunoglobulinas

3.1 Conceitos gerais.....	53
3.2 Receptores de IgG.....	55
3.3 Receptores de IgA.....	57
3.4 Cadeia gama, ITAM e ITIM.....	62
3.5 Receptores relacionados aos receptores Fc.....	69
3.6 Receptores de Fc e doenças inflamatórias.....	74

4 Mecanismos bacterianos de evasão

4.1 Conceitos gerais.....	79
4.2 Sinalização entre bactérias.....	85
4.3 Adesão bacteriana.....	87
4.4 Invasão.....	90
4.5 Exotoxinas.....	91
4.6 Subversão e sabotagem do sistema imune.....	92

5 Objetivos

5.1 Objetivos gerais.....	106
5.2 Peptídeos antimicrobianos.....	106
5.3 Receptores de Fc de Imunoglobulinas.....	107
5.4 Ensino.....	110
5.5 Pesquisa e captação de recursos.....	110
5.6 Extensão.....	111

6 Pacientes e Métodos

6.1 Aspectos éticos.....	114
6.2 Técnicas de Elisa e Miliplex.....	114
6.3 Técnica de PCR quantitativo.....	115
6.4 Immunoblotting.....	115
6.5 Phage Display.....	116
6.6 Imunoprecipitação de cromatina.....	120
6.7 Imuno-histoquímica.....	122
6.8 Microscopia confocal.....	123
6.9 Transcriptômica.....	123
6.10 Metabolômica, lipidômica e proteômica.....	127
6.11 Polimorfismos genéticos.....	128
6.12 Análise estatística.....	130
7 Resultados e Discussão	
7.1 Considerações gerais.....	131
7.2 Peptídeos antimicrobianos.....	134
7.3 Receptores Fc de Imunoglobulinas.....	140
7.4 Sepse no Idoso.....	143
7.5 Sepse no doente nefropata.....	152
7.6 Encefalopatia séptica.....	159
7.7 Polimorfismos genéticos.....	168
7.8 Sepse no paciente com trauma grave.....	174
8 Conclusão.....	180
9 Anexos.....	182
10 Referências.....	244

Lista de siglas

AA	ácido araquidônico
ADCC	citotoxicidade celular dependente de anticorpo
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMP	peptídeo antimicrobiano
APC	células apresentadoras de antígenos
BCR	receptor de linfócitos B
BHE	barreira hemato-encefálica
CARS	Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória ("Compensatory anti-inflammatory response syndrome")
CaSRs	receptores sensores de cálcio ("calcium-sensing receptors")
CD	"cluster of differentiation", marcador celular
Célula NK	célula "natural-killer"
CLP	modelo de punção e ligadura cecal
CRAMP	peptídeo antimicrobiano relacionado à catelina ("cathelin-related antimicrobial peptide")
DAG	Diacylglicerol
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ERK	Quinase reguladora de sinal extra-celular ("extracellular signal-regulated kinase")
FcR	Receptor Fc de imunoglobulinas
FcR β	cadeia β do Fc ϵ RI
Fc γ R	receptor Fc de IgG
Fc α R	receptor Fc de IgA
Fc μ R	receptor Fc de IgM
,Fc ϵ R	receptor Fc de IgE
Fc δ R	receptor Fc de IgD
FcR γ	cadeia gama dos FcRs
FcRH	Homólogos dos receptores Fc
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GM-CSF e M-CSF	Fatores estimuladores de crescimento de colônias ("granulocyte-macrophage colony-stimulating factor" e "macrophage colony-stimulating factor")
GPI	ligação glicosil-fosfatidil-inositol
GSP	vía secretória geral ("general secretory pathway")
HLA	sistema leucocitário humano
HSP	proteínas do choque térmico ("heat shock proteins")
IFN- γ	interferon gama
IgSF	Superfamília das imunoglobulinas
ILT	"Immunoglobulin-like Transcripts"
IP3	inositol trifosfato
ITAM	motivo imuno-ativador baseado em tirosina
ITIM	motivo imuno-inibitório baseado em tirosina

JAK	Janus quinase
JNK	quinase c-Jun N-terminal
KIR	"Killer-cell Ig-like receptors"
LIR	"Leukocyte Ig-like receptors"
lincRNAs	ácidos ribonucleicos não-codificantes longos
LPA	lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacáride
MAPK	"Mitogen-activated protein kinase"
MCP-1 e 2	"Monocyte chemoattractant proteins" 1 e 2
MHC	Complexo humano de histocompatibilidade
MIP	Proteína inflamatória macrofágica
MIR	"Monocyte/macrophage Ig-like receptors"
MSC	células mesenquimais pluripotenciais
NOS	"nitric oxide synthase"
PAF	fator ativador de plaquetas
PAMP	padrão molecular associado ao patógeno, ("pathogen-associated molecular pattern")
PCR	proteína-C reativa
PG	Prostaglandinas
PI 3-quinase	Fosfoinositídeo 3-quinase
PIR	"paired Ig-like receptors"
PKC	proteinoquinase C
PLA2	fosfolipase A2
PLC	fosfolipase C
PTH	hormônio paratireoideano
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto
SIgA	Imunoglobulina A secretória
SHIP	inositol polifosfatase 5-fosfatase
SHP-1, SHP-2	Tirosino-fosfatases com domínio homólogo a <i>Src</i> ("Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatases")
SIRS	Resposta Inflamatória Sistêmica ("Systemic Inflammatory Response Syndrome")
SNP	polimorfismo único de nucleotídeo ("single nucleotide polymorphism")
STAT	transdutor de sinal e ativador de transcrição
TAT	sistema de translocação com duas argininas ("twin-arginine translocation system")
TCR	receptor de linfócitos T
TCSTS	sistema de transdução de sinal de dois componentes
TGFβ	"Transforming growth factor-beta"
TLR	receptores "Toll-like"
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VDR	receptor de vitamina D

Lista de Figuras

Figura 1	Vias de sinalização celular da família dos receptores <i>Toll-like</i> . Adaptado de Takeda et al. <i>Ann Rev Immunol</i> , 2003.....	22
Figura 2	Os diversos efeitos da catelicidina LL-37.....	35
Figura 3	Como peptídeos antimicrobianos são catiônicos e a membrana celular das bactérias é aniônica, os AMPs conseguem lisar este tipo de célula com facilidade.....	36
Figura 4	Modelo estrutural de catelicidina, obtido por cristalografia.....	37
Figura 5	Mecanismos celulares deflagrados por LL-37 (Pinheiro da Silva et al., <i>Tissue and Cell</i> , 2013).....	39
Figura 6	Mecanismos deflagrados por receptores Fc de imunoglobulinas.....	54
Figura 7	Receptores Fc associados à cadeia gama e o receptor inibitório FcγRII.....	64
Figura 8	Agregação e sinalização celular induzida pelo FcαRI, um exemplo de ativação ITAM-mediada. Adaptado de Monteiro et al. IgA Fc Receptors. <i>Ann Rev Immunol</i> , 2003.....	67
Figura 9	Co-agregação do FcγRII ao BCR e inibição ITIM-dependente da ativação e proliferação celular (à esquerda). À direita, homo-agregação do FcγRII, induzindo apoptose de células B, independente de fosforilação do ITIM. Adaptado de Ravetch et al. <i>Ann Rev Immunol</i> , 2001.....	69
Figura 10	Cascata de sinalização celular induzida por receptores Fc e SiRPα.....	72
Figura 11	Receptores Fc conhecidos até o presente momento. Adaptado da Tese de Bernoit Pasquier, Université Paris V, 2004.....	74

Figura 12	Mecanismo desenvolvido por <i>E. coli</i> para evadir de fagocitose mediada pelo CD16 e seu bloqueio farmacológico como uma nova perspectiva terapêutica em sepse.....	141
-----------	--	-----

Resumo

da Silva FP. *Choque séptico: Integrando Imunologia e Biologia de Sistemas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Sepse é a principal causa de óbito em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Atualmente, ainda não se encontra disponível um biomarcador adequado, no intuito de detectar precocemente a presença de infecção, assim como servir de guia para monitorização da resposta clínica do paciente ao tratamento.

A pesquisa de novos marcadores de infecção é um dos objetivos principais deste projeto. Para tal fim, desenhamos um estudo prospectivo, em que acompanhamos pacientes sem infecção, internados em UTI, e coletamos informações clínicas e material biológico destes doentes antes, durante e após infecção nosocomial.

Com o material coletado, investigamos mecanismos moleculares da doença, por meio de técnicas imunológicas clássicas, assim como pela obtenção de dados em larga escala.

Estamos complementando estes estudos com projetos *in vitro* e em modelos experimentais, utilizando tanto animais selvagens, quanto geneticamente modificados. O material biológico obtido por meio desta estratégia é usado, igualmente, para experimentos de Imunologia e Biologia de Sistemas.

O cerne dos nossos estudos são a Família dos Receptores Fc de Imunoglobulinas (FcRs) e os Peptídeos Antimicrobianos (AMPs).

Descritores: choque séptico, sepse, inflamação, peptídeos catiônicos antimicrobianos, receptores Fc

Abstract

da Silva FP. *Septic shock: Integrating Immunology and Systems Biology* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Sepsis is the leading cause of death in Intensive Care Units (ICUs). A reliable biomarker to diagnose infection and to guide its treatment is still lacking. One of the main purposes of this project is to investigate potential sepsis biomarkers.

We designed a prospective study, in which we follow critically ill patients without infection, and evaluate their inflammatory and immune response before, during and after nosocomial infection. Our approach includes classical immunological techniques as well as high-throughput screening.

We are conducting *in vitro* studies and animal experiments, using both wild-type and genetically modified mice, to further dissect our findings.

The focus of our studies are the Immunoglobulin Fc Receptors (FcRs) and the Antimicrobial Peptides (AMPs).

Descriptors: septic shock, sepsis, inflammation, antimicrobial cationic peptides, Fc receptors

1 Introdução

1.1 Breve história da doença

As bactérias, apesar de serem, com frequência, associadas a doenças, desempenham papel importante em diversas situações, tais como em ciclos químicos, liberando gás carbônico e nitrogênio, decompondo material orgânico, auxiliando na digestão animal e produzindo diversos compostos, como álcool, ácido acético e acetona. Ademais, bactérias são utilizadas pelo homem, para a produção de diversas substâncias, tais como medicamentos, queijo, vinho e algodão. A maior parte dos cientistas acredita que as bactérias foram a primeira forma de vida na terra. Rochas de 3,5 bilhões de anos, encontradas na Austrália, já apresentam microfósseis de organismos procariotos.

Os humanos primitivos viviam da caça e da coleta. Eram nômades e viviam em pequenos grupos. Este estilo de vida é consistente com um baixo índice de doenças não-transmissíveis, as quais são mais facilmente associadas a dietas ricas em gordura, poucas fibras e sedentarismo. Este estilo de vida, em populações pouco numerosas e com pouco contato com outros grupos, além disso, é consistente com uma baixa incidência de doenças infecciosas agudas. Estudos recentes indicam que uma população necessita ter, pelo menos, 100.000 a 500.000 indivíduos para manter uma doença infecciosa aguda em circulação. Portanto, doenças infecciosas recorrentes ou crônicas, tais como lepra, sífilis ou tuberculose, são mais prováveis naquela época. Dados arqueológicos suportam essa noção.

Conforme o estilo de vida das populações primitivas foi mudando, entretanto, com a implantação do hábito da agricultura e a presença de

animais domésticos, o padrão de doenças se alterou. Há uns 6000 anos, cidades da Mesopotâmia, Egito e vales Hindus atingiram tamanhos críticos, surgindo problemas de estoque de alimentos, higiene e água. Animais domésticos, assim como outros que se multiplicaram nestas condições, tais como ratos, tornaram-se fonte frequente de doença. O problema se agravava em períodos de chuva e enchentes. Desta época, até a atualidade, as infecções agudas têm apresentado papel de destaque na história da humanidade. As epidemias de praga e tifo são alguns exemplos de como tais doenças tiveram impacto catastrófico.

A causa das doenças, para os povos primitivos, era sobrenatural, sendo considerada punição dos deuses, bruxaria de povos inimigos, possessão do demônio ou perda da alma. Isso começou a mudar, devido a Hipócrates (século V A.C.), que acreditava que as doenças tinham causas naturais, e que a observação detalhada do curso de uma doença poderia prever seu curso em episódios futuros, assim como nortear propostas de tratamento. Com a queda da civilização greco-romana, entretanto, é interrompido por um milênio o progresso do pensamento científico.

A história das doenças infecciosas se mistura, a partir do século XVII, com a história da microbiologia. Em 1609, Galileu constrói um microscópio. Em 1620, Francis Bacon começa a enfatizar a importância da metodologia científica. Em 1683, Anton van Leeuwenhoek identifica bactérias, pela primeira vez na História, usando lentes simples. Em 1840, Friedrich Gustav Jakob Henle, sugere que microrganismos podem causar doenças. Em 1861, Louis Pasteur rejeita, com bases científicas, a teoria da geração espontânea.

Em 1866, Pasteur comprova a teoria de que germes são causadores de doenças.

Em 1880, o biólogo russo Elie Metchnikoff descobre o processo de fagocitose, ao observar a ingestão de bactérias por células leucocitárias. Ele conclui, na época, que o propósito da inflamação seria o de trazer células fagocíticas para o local da lesão, a fim de ingerir bactérias. Tal opinião contradiz a ideia, então vigente, de que o propósito da inflamação era trazer para o local da lesão, fatores séricos neutralizadores (anticorpos). Com trabalhos demonstrando que ambos os fatores são importantes protagonistas da resposta inflamatória, Metchnikoff e Paul Ehrlich (autor da teoria humoral) dividiram o Prêmio Nobel de 1908.

Louis Pasteur e Robert Koch foram os pioneiros na descoberta de que as bactérias são agentes causadores de doenças. Pasteur, além disso, produziu as primeiras vacinas com vírus atenuados, incluindo, em 1885, a vacina contra raiva. Em 1882, foram descritos os postulados de Koch, que preconizavam que para se provar que um determinado microorganismo é o causador de determinada doença, faz-se necessário: 1) que o organismo seja encontrado em lesões típicas da doença; 2) que o organismo possa ser isolado, a partir destas lesões, em meio de cultura sólido; 3) que inoculação deste agente cause a doença em modelos animais e 4) que o organismo possa ser recuperado no modelo animal. Koch, ademais, isolou as bactérias causadoras de tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) e anthrax (*Bacillus anthracis*).

Em 1885, Theodor Escherich identifica *Escherichia coli*, como um habitante natural do intestino.

Em 1901, James Carroll prova que a febre amarela é causada por um vírus. Foi a primeira demonstração de que vírus são capazes de causar doenças em humanos.

Em 1901, F. Peyton Rous encontra evidências que apontam as doenças infecciosas como possíveis causadores de câncer. Hoje, conhecemos diversos exemplos desta associação, dentre elas, a infecção gástrica por *H. pylori*.

Em 1908, Paul Erlich desenvolve a droga Salvartan para o tratamento de sífilis. É o início do uso de agentes quimioterápicos para o tratamento de doenças infecciosas. Recebe, por isso, o prêmio Nobel.

Em 1944, Oswald Avery demonstra que transferência do DNA de formas virulentas de *Streptococcus pneumoniae* para formas avirulentas, faz com que estas últimas adquiram um fenótipo patogênico. Hoje, com o sequenciamento genômico, descrito para várias espécies, incluindo-se desde bactérias até o ser humano, a biologia molecular tem se demonstrado, cada vez mais, um instrumento poderoso para a pesquisa da patogênese, diagnóstico e tratamento de diversos processos infecciosos.

Apesar de doenças infecciosas, tais como lepra, serem conhecidas desde os tempos bíblicos, um surpreendente número de novos agentes infecciosos continua a ser descrito. Exemplos incluem a AIDS (1983), a Doença de Lyme (1982) e a SARS (Síndrome Respiratória Aguda Severa), cujo vírus causador foi identificado em 2003.

Diversos fatores demográficos e comportamentais, cabe lembrar, influem para a emergência de doenças infecciosas. Resistência microbiana a antibióticos de utilização frequente é outro fator importante para o

desenvolvimento de novas cepas, alterando características biológicas marcantes destes microrganismos.

Há muito tempo se reconhece que mulheres no puerpério se encontram sob risco aumentado de infecção. Referência a isto pode ser encontrado, até mesmo, em textos de Hipócrates, assim como em textos hindus, datados de antes de 1500 A.C. Apesar disso, na antiguidade e no período medieval, a mortalidade por sepse puerperal era, aparentemente, baixa.

No século XVII, entretanto, os partos começaram a ser realizados por médicos, em diversos hospitais. Apesar de ser considerado um avanço, com a possibilidade de resolução de partos mais complicados, a superlotação destes serviços, os exames frequentes e a falta de antissepsia, levou a um aumento alarmante nas complicações infecciosas.

A primeira epidemia de sepse puerperal que se tem relato, ocorreu em 1646 no Hôtel de Dieu, em Paris. Subsequentemente, diversos hospitais em toda a Europa e América do Norte apresentaram surtos desta doença e, mesmo fora dos períodos de epidemia, uma em cada quatro a cinco gestantes adquiria infecção no puerpério.

Diversas teorias bizarras tentaram explicar a origem desse problema. Causa contagiosa é aventada, pela primeira vez, em 1842, por Thomas Watson, um médico inglês que também sugeriu lavagem das mãos e troca das roupas por parte dos médicos, antes da realização dos partos. Tal sugestão, entretanto, foi completamente ignorada pela comunidade científica.

Na mesma época, nos Estados Unidos da América, outro médico chega à mesma conclusão. Seu nome é Oliver Wendell Holmes e, em 1843,

ele publica seu clássico livro, “The contagiousness of puerperal fever”. Nele, além da lavagem de mãos e da troca de roupas, aconselha que médicos que atendem casos obstétricos, não realizem autópsias. As conclusões de Holmes, na época, foram extremamente ridicularizadas.

Enquanto isso, em Viena, Dr. Ignaz Semmelweiss, um médico húngaro, por não ter domínio do idioma inglês e por estar distante da América, desconhecia os trabalhos de Holmes. Em 1844, Semmelweiss, entretanto, observa que, enquanto na primeira divisão do serviço de obstetrícia em que trabalhava 16% das mulheres tinham morrido por sepse puerperal, na segunda divisão a mortalidade era bastante inferior, em torno de 2%. Semmelweiss observa, ainda, que, enquanto na primeira divisão os partos eram realizados por estudantes de medicina, na segunda divisão, eram realizados por parteiras. Notou, além disso, que os estudantes de medicina realizavam autópsia de pacientes que haviam morrido há poucas horas, enquanto que as parteiras não realizavam esse tipo de serviço.

Em março de 1847, Jakob Kolletschka, um amigo de Semmelweiss, morre de sepse, após cortar, acidentalmente, o próprio braço, durante a realização de uma autópsia. Fazendo a conexão entre a morte do amigo e as mortes por febre puerperal, devido à similaridade dos sintomas, Semmelweiss propõe que as mãos dos estudantes e médicos, contaminadas pelas autópsias recentes, transmitiriam “agentes invisíveis” para os órgãos genitais das mulheres, durante os partos. Ordena que todos os médicos e estudantes lavem as mãos com solução antisséptica, antes dos partos. A mortalidade por sepse puerperal, no mesmo ano, cai de 18 para 3%. A comunidade médica, entretanto, vê com ceticismo tais resultados e, dois anos mais tarde, seu

contrato de trabalho não é renovado. Seus resultados científicos são publicados somente em 1861.

Semmelweiss viveu seus últimos anos de vida com depressão e distúrbios mentais. Em 1865, é internado em um manicômio em Viena. Morreu ali poucas semanas mais tarde, ironicamente, de sepse.

Poucos anos após sua morte, a doutrina de Semmelweiss começa a ser finalmente aceita pela comunidade médica. Em 1874, Bilroth demonstra estreptococos em lesões traumáticas de pele. Em 1879, Louis Pasteur isola estreptococos hemolíticos do sangue de uma paciente em sepse puerperal. No final do século XIX, a importância das técnicas de antissepsia já era algo largamente aceito (1).

1.2 Conceitos iniciais

Os mecanismos que desencadeiam uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) levam a uma alta mortalidade e correspondem à primeira causa de óbito em Unidades de Terapia Intensiva não-coronarianas. Sepse é o nome atribuído, em específico, para a SIRS que tem origem infecciosa, apesar de existirem diversas causas não-infecciosas de SIRS. Sepse é uma doença pouco compreendida e o manuseio dos fenômenos imunológicos a ela subjacentes, visando o seu tratamento, faz parte ainda da medicina experimental (2).

Apesar do desenvolvimento crescente de diversos métodos diagnósticos e terapêuticos, a taxa de mortalidade devido à sepse permanece, há décadas, em torno de 30 a 40% (3). Se analisarmos grupos específicos, como doentes idosos e com doenças crônicas, essa taxa se eleva a índices que giram em torno de 70%. No presente momento, além do

uso de agentes antimicrobianos e do suporte inespecífico da vida, pelo uso, por exemplo, de drogas vasoativas, ventilação mecânica e métodos dialíticos, pouco mais pode ser feito. Muitos destes métodos, além disso, se tornaram fonte significativa de infecção nosocomial, enquanto que o uso indiscriminado de antibióticos acaba propiciando a seleção de bactérias resistentes.

A elevada mortalidade decorrente de um episódio de sepse foi, durante a década de 80, atribuída a uma ativação, explosiva e desgovernada, de mecanismos pró-inflamatórios. Componentes da bactéria, desta forma, levariam a um descontrole da resposta imune e os efeitos deletérios decorrentes acabariam sobrepujando os efeitos benéficos, levando, não raro, o indivíduo à morte. Diversas estratégias, desta forma, foram investigadas no intuito de controlar essa hiperatividade inflamatória, algumas delas, chegando à fase de ensaio clínico. Em decorrência dos repetidos resultados negativos, após um longo período, esse conceito começou a ser repensado. Na metade da década de 90, foi proposta a hipótese de que uma resposta anti-inflamatória maciça, compensatória, teria papel importante na patogênese desta doença e poderia explicar o insucesso das drogas que inibem a resposta inflamatória (3). Neste caso, tais terapêuticas agravariam ainda mais essa resposta anti-inflamatória compensatória e os pacientes acabariam morrendo, na verdade, devido a uma imunossupressão severa.

Esta resposta anti-inflamatória, nomeada de CARS (“Compensatory anti-inflammatory response syndrome”), deflagrada pela resposta pró-inflamatória inicial, desta forma, seria uma nova avenida para a compreensão desta doença (4-6). Atribui-se à CARS, certas deficiências características do sistema imune, pouco compreendidas e encontradas com frequência em

pacientes sépticos, tais como apresentação antigênica ineficaz, hiporresponsividade de linfócitos T, anergia, proliferação diminuída de células Th1 e apoptose, principalmente de linfócitos, células dendríticas e células epiteliais intestinais. Disfunção orgânica, decorrente de morte celular por apoptose, assim como imunossupressão, decorrente da morte de linfócitos, podem contribuir para infecções secundárias. Além disso, fagocitose de células apoptóticas por macrófagos pode estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (7). Os níveis séricos de IL-10, inclusive, são preditores de mortalidade (8). Caminhando neste sentido, algumas publicações chegaram a relatar melhora na sobrevida de pacientes sépticos, decorrente de manipulação farmacológica da resposta Th2 (8). No mais, alguns autores acreditam que a resposta anti-inflamatória em sepse pode ocorrer de maneira independente da resposta pró-inflamatória. Não seria, neste caso, uma resposta antagonística. Seria, na verdade, característica subjacente de alguma condição crônica ou aguda do doente. Tal hipótese justifica, assim, a maior incidência de infecção em determinadas populações, como, por exemplo em pacientes politraumatizados (9, 10).

Esse conceito de respostas contra-regulatórias em desarmonia está se solidificando com o decorrer dos anos, sendo extremamente atual. Existe reconhecimento crescente de que um largo número de pacientes não apresenta resposta pró-inflamatória exagerada, apresentando, por outro lado, sinais de anergia e imunossupressão. Entretanto, conforme já comentado, a intensidade e o sentido da resposta inflamatória são imensamente variáveis e condicionados a diversos fatores (11), como faixa etária, antecedentes mórbidos e doenças co-existent, aspecto de difícil transposição para

estudos experimentais. Tal fato justifica em boa parte os lentos progressos na compreensão desta doença. Sepsé, enfim, é uma doença heterogênea, tanto com relação à diversidade populacional na qual pode se manifestar, quanto temporalmente, ao longo do seu curso, em um mesmo indivíduo.

Como esta doença acomete doentes de diferentes faixas etárias e com antecedentes mórbidos diversos, acredita-se que grupos de pacientes semelhantes tendem a desenvolver uma resposta imune, seja pró ou anti-inflamatória, característica. Indivíduos jovens e previamente saudáveis tenderiam a uma resposta pró-inflamatória descontrolada, enquanto que, por exemplo, pacientes idosos e com doenças associadas, evoluíam rapidamente para um estado de imunodepressão e anergia, existindo ainda um amplo espectro de apresentações entre esses dois extremos dentro do qual essa doença pode se manifestar.

O mecanismo exato pelo qual os pacientes morrem, apesar de tudo, continua desconhecido. Necrópsias realizadas pouco após a morte, em pacientes sépticos, não evidenciam lesões que justificam a morte ou que não poderiam ter sido contornadas por tratamento de suporte. A realidade, na maioria das vezes, é que o paciente acaba morrendo inesperadamente por colapso cardiovascular ou choque refratário, ou, ainda, quando os médicos decidem interromper a progressão dos esforços (2), após um longo período de internação na UTI, quando o indivíduo já se encontra em insuficiência de múltiplos órgãos, sem expectativas de melhora ou qualidade de vida.

Além da complexidade e multiplicidade de mecanismos que interagem na patogênese de um episódio de sepsé, outros fatores colaboraram para a dificuldade de dissecar os eventos envolvidos na evolução desta doença.

Dentre eles, teve particular efeito negativo o uso insistente de modelos animais inadequados para o estudo do assunto em questão. Ensaio clínico com drogas anti-inflamatórias e anticorpos monoclonais, por exemplo, visando o controle de uma pressuposta hiperatividade imune, foram iniciados na época, devido aos resultados animadores obtidos em experimentos com animais. Apesar de diversos destes experimentos terem sido realizados com modelos que confirmaram, posteriormente, sua semelhança com os achados clínicos e fisiopatológicos encontrados em humanos, notadamente os modelos animais de peritonite, grande parte destes trabalhos utilizaram modelos de injeção endovenosa de bactérias ou fragmentos bacterianos.

Ainda no que se refere a modelos animais, foi vivenciado um impressionante avanço na elucidação dos mecanismos de ação de inúmeras proteínas, a partir do final da década de 80, graças à obtenção de organismos geneticamente modificados. Indiscutivelmente, o desenvolvimento das técnicas de transgênese e “knockout” possibilitaram um enorme avanço no campo da Ciência.

Sepse permanece um terreno no qual impera o desconhecido. A passos tímidos, entretanto, nosso conhecimento avança.

1.3 Sepses – Aspectos clínico-epidemiológicos

Sepses, segundo o consenso atual, é uma doença definida por critérios clínicos. Mediante reunião de especialistas no tema, organizada em 1991 pelo “American College of Chest Physicians” e pela “Society of Critical Care Medicine” (12), no intuito de padronizar a nomenclatura, até então confusa, sobre essa doença, as seguintes definições foram propostas, sendo até hoje respeitadas:

- Infecção: Fenômeno microbiano caracterizado por uma resposta inflamatória à presença destes microrganismos ou à invasão de tecidos do hospedeiro, normalmente estéreis, por estes agentes
- Bacteremia: Presença de bactérias viáveis no sangue
- Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS): Resposta inflamatória sistêmica, deflagrada por infecção ou por diversos outros insultos, tais como pancreatite, isquemia, trauma, choque hemorrágico, administração exógena de mediadores inflamatórios, entre outros. É caracterizada pela presença de ao menos dois, dos seguintes parâmetros: 1) hipotermia (temperatura corpórea menor do que 36°C) ou febre (acima de 38°C); 2) Taquicardia (frequência cardíaca acima de 90bpm); 3) taquipnéia (frequência respiratória acima de 20ipm ou pCO₂ abaixo de 32mmHg; 4) leucocitose (contagem de leucócitos acima de 12x 10⁹ células/L), leucopenia (abaixo de 4 x 10⁹) ou mais do que 10% de formas imaturas.
- Sepses: Resposta inflamatória sistêmica à infecção.
- Septicemia: O uso deste termo é desencorajado, por ser ambíguo e frequentemente utilizado, inapropriadamente, para se designar bacteremia.
- Sepses severas: Sepses, acompanhadas de disfunção orgânica e anormalidades de perfusão (acidose láctica, oligúria, alterações do nível de consciência, por exemplo), na ausência de outras causas conhecidas para essas anormalidades ou acompanhadas de episódios de hipotensão (pressão sistólica < 90mmHg ou redução de 40mmHg dos valores basais), responsivos a hidratação vigorosa

- Choque séptico: Sepses na presença de hipotensão, irresponsiva a hidratação vigorosa, em conjunto com disfunção orgânica e anormalidades de perfusão, na ausência de outras causas conhecidas para essas anormalidades.
- Síndrome de insuficiência de múltiplos órgãos: Presença de função anormal de três ou mais órgãos, em paciente crítico, no qual homeostasia não pode ser mantida sem intervenção.

Uma revisão das hospitalizações ocorridas de 1979 até o ano de 2000, nos Estados Unidos da América, identificou 10.319.418 casos de sepse nesse período (3). Sepses foi mais frequente em homens do que em mulheres (risco relativo de 1,28) e entre indivíduos de raça não-branca do que em indivíduos de raça branca (risco relativo de 1,90). Foi observado, no período, um aumento de 8,7% na incidência dessa doença, sendo as bactérias gram-positivas o agente predominante desde 1987, superando a primazia, até então, dos germes gram-negativos. A incidência de sepse por infecção fúngica aumentou em 207%. A mortalidade intra-hospitalar diminuiu de 27,8% (1979 a 1984) para 17,9% (1995 a 2000), apesar do número total de mortes ter continuado a aumentar.

O sítio de infecção ou o agente etiológico são aspectos fundamentais no manejo de um episódio de sepse. Dentre os fatores que permitem a invasão de bactérias na circulação sanguínea, cabe ressaltar: (1) alteração na flora do hospedeiro, contribuindo para o crescimento de outras bactérias; (2) disfunções do sistema imune; (3) permeabilidade aumentada das barreiras epiteliais, não raro devido a mecanismos de tratamento e monitorização invasivos.

Os pulmões são o local mais comum de infecção, seguidos do abdômen e trato urinário (13). Em 20 a 30% dos pacientes, um sítio de infecção não é determinado e, mesmo quando um local é fortemente suspeito, as culturas com frequência se demonstram estéreis e o resultado dos estudos microbiológicos, questionáveis. Hemoculturas positivas são encontradas em apenas 30% dos casos. Infecções pleurais, pericárdicas e em seios paranasais podem passar facilmente despercebidas. Nenhum exame de imagem, além disso, pode descartar um foco suspeito de maneira definitiva.

A dificuldade de se confirmar microbiologicamente um episódio de sepse, reflete diretamente sobre a demora no progresso da compreensão dos fenômenos subjacentes a essa doença. A teoria de que a alta mortalidade em sepse se deve a uma estimulação pró-inflamatória exagerada do sistema imune, como já comentado, foi baseada em estudos animais que utilizaram largas doses de endotoxina ou bactérias e, conseqüentemente, os níveis de citocinas, como $\text{TNF}\alpha$, se elevaram a valores exponencialmente maiores do que o encontrado em pacientes sépticos, não reproduzindo adequadamente, portanto, as características dessa doença. Estudos clínicos, por sua vez, são de elevada complexidade, devido não só à dificuldade em se isolar o agente etiológico, mas à ampla heterogeneidade dos pacientes nos seus mais diversos aspectos, como sexo, idade, doenças associadas e antecedentes mórbidos.

Antimicrobianos são necessários, porém não suficientes para o tratamento de sepse e, paradoxalmente, podem desencadear uma piora clínica por liberação de produtos microbianos. A administração precoce e eficaz de agentes antimicrobianos, entretanto, diminui a mortalidade em 10 a

15%, com relação a pacientes que não os recebem rápida e corretamente.

Desta forma, a conduta habitual é a administração de antibioticoterapia de amplo espectro, quando o agente é incerto, a qual é reavaliada, quando se consegue definir a etiologia e a sensibilidade do agente.

Tratamento de suporte correto é imprescindível. A mortalidade aumenta em 15 a 20%, para cada órgão que entra em insuficiência (2). Disfunção pulmonar ocorre precocemente e tem curso prolongado, enquanto que choque, que também ocorre precocemente, é resolvido rapidamente ou é fatal. Aproximadamente 85% dos pacientes necessitam de suporte ventilatório e quase metade preenche os critérios para Síndrome da Angústia Respiratória do Adulto (SARA). Anormalidades da função hepática, neurológica e da coagulação tendem a ocorrer horas a dias após o início da sepse e persistem por períodos intermediários. Insuficiência renal aguda é extremamente comum e pode requerer tratamento dialítico, apesar disso ocorrer em apenas 5% dos casos. Na maioria das vezes tem caráter transitório.

Tratamento de suporte adequado, portanto, assim como a prevenção de complicações (trombose venosa profunda, úlceras de stress, úlceras de decúbito, aspiração naso-gástrica, desnutrição proteico-calórica, entre outras), parecem justificar boa parte da diminuição de mortalidade observada nos últimos anos, já que além do uso de antibióticos e da erradicação do foco de infecção, pouco mais se pode oferecer em termos de benefícios terapêuticos concretos. Tais avanços terapêuticos, entretanto, apesar de lentos e quase que invariavelmente em fase experimental, são nítidos. Em grande parte, decorrentes dos resultados desapontadores do passado.

A fase, durante a década de 80, em que se tentou diminuir a mortalidade por sepse pelo uso de agentes anti-inflamatórios, e seu evidente insucesso, impôs reavaliação desta hipótese e novas ideias. A teoria de que morte por sepse é decorrente de uma resposta pró-inflamatória exagerada foi baseada em estudos animais que não refletem o quadro clínico encontrado em humanos. Estudos mais recentes têm demonstrado que a frequência de uma resposta inflamatória exagerada é menor do que antes se pensava. Debets et al. relataram que somente 11 de 43 pacientes sépticos estudados tinham níveis detectáveis de TNF α na circulação (limite de detecção de 5 pg/ml) (14). Em outro estudo com 87 pacientes, de maneira semelhante, menos de 10% tinham níveis detectáveis de TNF α ou IL-1 β (15, 16).

Apesar de uma resposta inflamatória exagerada continuar a ser algo considerado como um mecanismo importante na fisiopatologia dessa doença, já está suficientemente claro que a abolição dos fenômenos pró-inflamatórios, além de não ser uma forma eficaz de tratamento, resulta em respostas analogamente deletérias. Mesmo que ainda se acredite que uma resposta inflamatória exacerbada é maléfica, parece claro que níveis mínimos são necessários para o combate a uma infecção. Bloqueio dos efeitos de TNF α , após peritonite induzida em roedores, por exemplo, piorou a sobrevida desses animais (17). Em estudos clínicos, da mesma forma, administração de um antagonista de TNF α aumentou a taxa de mortalidade (18). Ademais, pouco após um insulto bacteriano, um período refratário sabidamente se manifesta, sendo caracterizado por uma redução na capacidade das células mononucleares de produzirem citocinas pró-inflamatórias e uma maior inibição da resposta pró-inflamatória pode prolongar esse período de maneira

indesejada. Tal fenômeno é conhecido como tolerância à endotoxina, apesar desta designação não ser adequada, porque endotoxina não é a única substância à qual tais células se mostram refratárias durante esse período e exposição prévia à endotoxina não é um pré-requisito obrigatório para esse fenômeno acontecer. Meta-análises, no entanto, sugerem que apesar do efeito em geral negativo, certos grupos podem se beneficiar dessas estratégias imunossupressoras (19).

Havendo ou não esse benefício, incerto e restrito a determinadas subpopulações de pacientes, ainda parece que o progresso de maior impacto tem sido a lenta, porém nítida evolução na compreensão dos fenômenos que circundam tal doença. Conforme foi dito há quase uma década, “somente compreendendo perfeitamente como as proteínas implicadas nestas respostas agem, se será possível desenvolver agentes efetivos que combatam seus efeitos destrutivos, preservando seus efeitos benéficos” (20). Igualmente importante, parece a percepção de que tamanha heterogeneidade populacional não pode ser abordada sem que se consiga distinguir qual a resposta predominante, ou seja, em qual espectro um determinado paciente se encontra. Uma nova classificação da doença, na tentativa de se caracterizar melhor os seus diversos sub-grupos foi, por tais motivos, proposta há alguns anos (21).

1.4 Imunidade Inata

A imunidade costuma ser dividida em inata e adaptativa. A imunidade adaptativa é mediada por linfócitos B e T, distribuídos clonalmente. A imunidade inata, por sua vez, por um longo período foi considerada uma resposta inespecífica, caracterizada pela internalização e digestão de

microrganismos e substâncias estranhas, por macrófagos e leucócitos.

Entretanto a imunidade inata tem especificidade considerável, sendo capaz de discriminar os patógenos do hospedeiro e atacar imediatamente organismos estranhos, sem necessidade de exposição prévia.

Inicialmente, a rápida reação inflamatória devido a uma infecção é mediada, principalmente, por monócitos, neutrófilos e células endoteliais, podendo ser reproduzida *in vitro* sem componentes da imunidade adquirida. Uma série de substâncias quimiotáticas para neutrófilos aumenta o número dessas células, rapidamente, no sítio de infecção. Os neutrófilos são as células fagocíticas recrutadas mais precocemente, seguidos pelos monócitos. Componentes bacterianos estimulam diretamente o aumento na expressão de células de adesão, no endotélio, contribuindo para o recrutamento de leucócitos. Integrinas participam regulando o tráfego de leucócitos. A ativação dos leucócitos, além disso, produz espécies reativas do oxigênio, que contribuem para o ataque aos microrganismos invasores. Ocorre estímulo, ainda, para a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e IL-1 β , que amplificam a resposta à infecção (22). Diversos elementos da resposta imune são ativados pela liberação de citocinas, sendo os efeitos principais a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, que podem se ligar à superfície das bactérias e ativar o sistema do complemento ou fagocitose, assim como sustentar os mecanismos deflagrados diretamente pelas bactérias, como indução de reação inflamatória local, alterar características da superfície e permeabilidade dos vasos sanguíneos e permitir o recrutamento de fagócitos, células imunes e diferentes moléculas para o sítio infeccioso.

A cascata do complemento é ativada, por meio das conhecidas vias clássica e alternativa. Na primeira, C3, o componente inicial de ambas as cascatas é ativado por anticorpos (IgG e IgM) que se encontram ligados ao antígeno. No que se refere à imunidade inata, no entanto, a via de defesa mais importante é a cascata alternativa, na qual C3 se cliva espontaneamente e se liga à superfície dos patógenos. Ambas as vias geram, por fim, as moléculas efetoras do complemento e o complexo de ataque à membrana. As principais consequências são opsonização do patógeno (C3b, C4b), recrutamento de células inflamatórias (C3a, C5a) e lise direta do patógeno (C5b, C6, C7, C8, C9). A ativação do complemento pela via alternativa ocorre nas primeiras horas após uma infecção. Para controlar invasão microbiana local, o recrutamento de mais fagócitos e proteínas de fase aguda é estimulado pela liberação de citocinas e diversos mediadores inflamatórios, como espécies reativas do oxigênio, óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas). Alterações endoteliais, por fim, induzidas pelos mediadores inflamatórios, promovem a expressão de moléculas que favorecem um estado pró-coagulatório, o que pode ter um papel de contenção local do patógeno no sítio de infecção. Quando ocorre bacteremia, porém, os mesmos mecanismos que contêm localmente uma infecção, podem induzir resposta inflamatória sistêmica, levando à vasodilatação, instabilidade hemodinâmica, depressão miocárdica, distúrbios metabólicos, coagulação intravascular disseminada e lesão de múltiplos órgãos. A imunidade inata é capaz de reconhecer sinais endógenos de perigo (“heat shock proteins”, por exemplo) ou dano celular (necrose) e, desta forma, não necessita obrigatoriamente de agentes

infecciosos ou exógenos para ser ativada, o que nos ajuda a compreender resposta inflamatória sistêmica após eventos como isquemia prolongada, lesão extensa de partes moles, pancreatite aguda ou choque hemorrágico (23).

A especificidade da resposta inata começou a ser melhor compreendida com a descrição dos receptores *Toll-like*. Esses receptores são ativados por moléculas produzidas por diversos micro-organismos. Tais moléculas, designadas PAMPs (“pathogen-associated molecular patterns”, padrões moleculares associados a patógenos), não são produzidas por células humanas. Entre eles, são conhecidos o lipopolissacáride (LPS), o ácido lipoteicoico, o peptidoglicano, fragmentos de DNA bacteriano, a flagelina, o zymosan, o taxol, dentre vários outros. Receptores *Toll-like* são capazes de reconhecer essas moléculas e ativar, assim, a resposta inata.

TLRs são proteínas transmembrana, compondo até o presente momento uma família de 10 receptores em humanos, com motivos ricos em leucina na sua porção extra-celular, assim como uma porção citoplasmática que é homóloga à do receptor de IL-1 β . São expressos em células do sistema imune, assim como em diversas outras, tais como células endoteliais, adipócitos e miócitos.

Os diversos membros dessa família têm distribuição heterogênea, não respondendo aos mesmos estímulos. O mesmo receptor *toll-like*, em contrapartida, responde a estímulos surpreendentemente diversos. TLR2, por exemplo, além de cooperar para a discriminação de patógenos com TLR1 e 6, reconhece lipoproteínas, peptidoglicano, zymosan, porinas e diversas formas atípicas de LPS. TLR4 é um receptor que reconhece, dentre outras

moléculas, o LPS de enterobactérias como *E. Coli* e *Salmonella spp*, frequentes causadoras de sepse.

Um dos primeiros indícios da importância desses receptores de imunidade inata foi a observação de que camundongos C3H/HeJ, que são deficientes na resposta a LPS, são homozigotos para uma mutação no gene *tlr4*, que substitui histidina por prolina na posição 712. A partir de então, começou a se tornar evidente a importância deste receptor na defesa contra microrganismos que expressam endotoxina (24). Camundongos deficientes em TLR4 são hipo-responsivos a LPS, confirmando que tal receptor é essencial para o seu reconhecimento.

A via de sinalização da família dos TLR é extremamente homóloga à da família do receptor de IL-1 β (25). Ambas interagem com uma molécula adaptadora, MyD88, que se associa tanto com os TLRs, como com o receptor de IL-1 β . Mediante estímulo, MyD88 recruta uma serina/treonina quinase, a quinase associada a receptor de IL-1 (IRAK), que é ativada por auto-fosforilação e se associa, por sua vez, a TRAF6, levando à ativação de duas vias de sinalização, JNK e NF- κ B. A atividade do NF- κ B é regulada pela sua associação a I κ B, que sequestra NF- κ B no citoplasma até sua fosforilação pelo complexo I κ B quinase (IKK). Esta fosforilação leva à dissociação e translocação nuclear do NF- κ B (**Figura 1**). LPS é capaz de induzir ativação de NF- κ B sem ativação prévia de MyD88, porém isso ocorre com uma cinética mais lenta. De maneira similar ao TLR4, cada TLR parece ter outras vias de sinalização, além da via comum dependente de MyD88. Vias de sinalização alternativas e/ou deflagradas em situações particulares foram descritas nos últimos anos, acrescentando complexidade significativa à sinalização induzida

por TLRs (26-30). Além disso, outras famílias de receptores de reconhecimento de padrões foram identificadas, sendo intenso objeto de pesquisa na atualidade. Exemplos incluem os receptores RIG-I-like, os receptores NOD-like, os receptores de lecitina e os receptores de DNA (31-33).

Figura 1 - Vias de sinalização celular da família dos receptores *Toll-like*. Adaptado de Takeda et al. *Ann Rev Immunol*, 2003

LPS é um componente da membrana celular de bactérias gram-negativas, sendo um complexo glicolipídico, composto de um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico, conhecido como lipídeo A, o qual é responsável pela atividade biológica do LPS. O LPS se une a uma proteína carreadora sérica (LBP – “LPS binding protein”) e, na membrana celular, se liga ao CD14. Entretanto, devido à presença no soro de CD14 solúvel, células que não expressam CD14 também podem responder a LPS. CD14 não ativa,

entretanto, sinalização intracelular, necessitando se acoplar ao TLR4 para que isso ocorra. MD-2 foi identificada como uma molécula que se associa com a porção extra-celular do TLR4 e aumenta a responsividade a LPS. Por meio de experimentos com camundongos “knockout” para MD-2, foi demonstrado seu papel essencial nessa resposta. Outra proteína de superfície celular, RP105, também está envolvida no reconhecimento de LPS. RP105 é expressa, preferencialmente, em células B e associa-se, funcionalmente, ao TLR4 para o reconhecimento de LPS. Portanto, diversos componentes estão implicados no reconhecimento de LPS, demonstrando que esse receptor funcional forma um grande complexo (34).

LPS é rapidamente internalizado no citoplasma, após ligação à superfície celular, o que parece importante para certas respostas celulares, sugerindo que LPS deve ser reconhecido no citoplasma, assim como na superfície. Com efeito, uma publicação recente descreveu que LPS é capaz de ativar o inflamassomo e que essa ativação independe de TLR4 (35). Uma outra molécula candidata ao seu reconhecimento intra-celular é Nod1, já que Nod1 induz ativação de NF- κ B em resposta a LPS (36). NF- κ B regula a transcrição de mais de 150 genes, particularmente aqueles relacionados a uma atividade pró-inflamatória, como TNF α , IL-6, IL-8, cicloxigenase-2, iNOS e LBP. A forma transcripcionalmente ativa do NF- κ B é um homo ou heterodímero, constituído de várias proteínas pertencentes à família do NF- κ B. Estas proteínas incluem p50, p65, c-Rel, p52 e Rel-B. A forma mais abundante é um heterodímero constituído de p65 e p50 (37, 38). Ativação de NF- κ B é considerado um marcador de mau prognóstico em sepse (39).

As MAPKs p38, ERK e JNK têm um papel importante na ativação da resposta inata. p38 é ativada por produtos bacterianos, como LPS ou peptidoglicano, ou citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$. Diversos mecanismos de cooperação entre as vias de sinalização das MAPKs e do NF- κB estão sendo esclarecidas.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, $\text{IL-1}\beta$, IL-12 , IL-18 e $\text{TNF}\alpha$ são as de maior relevância e as mais estudadas em sepse. IL-2 , IL-8 e $\text{IFN}\gamma$ são, igualmente, citocinas pró-inflamatórias secretadas em sepse.

$\text{TNF}\alpha$ é produzido por monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, NK e linfócitos T, sendo a primeira citocina liberada por monócitos e macrófagos em resposta à endotoxina. Atingindo níveis séricos máximos, 1 a 2 horas após a infusão de LPS. Além de LPS, sua liberação é estimulada por $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 , $\text{IFN}\gamma$, PAF e C5a , sendo inibida por IL-4 , IL-10 , IL-13 , $\text{TGF}\beta$, corticoesteróides e por substâncias que aumentam o AMP cíclico (cAMP) intracelular, tais como a PGE_2 , os inibidores da fosfodiesterase e os agonistas β_2 adrenérgicos. $\text{TNF}\alpha$ induz a secreção de $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 , IL-10 , PAF, eicosanóides, antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) e do receptor de TNF solúvel (TNFR solúvel). $\text{TNF}\alpha$ é um potente ativador de macrófagos e neutrófilos e induz a produção de $\text{IL-1}\beta$ e de moléculas de adesão por células endoteliais. Ele induz hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, acúmulo de neutrófilos nos pulmões, anorexia, diminuição do fluxo sanguíneo esplâncnico, dano à mucosa intestinal, hiperglicemia, alterações no perfil lipídico, acidose, coagulação e, por ação direta no hipotálamo, hiperpirexia.

IL-1 apresenta duas isoformas, a IL-1 α e a IL-1 β . IL-1 α é uma proteína ancorada à membrana que sinaliza por mecanismos autócrinos e parácrinos, enquanto que a IL-1 β é liberada para o meio extracelular, por clivagem que depende de ação da enzima conversora de IL-1 β (ICE), também conhecida como caspase-1. A expressão gênica de IL-1 β é estimulada por LPS, ácido teicóico, TNF α , GM-CSF, M-CSF, IFN γ e TGF β . IL-4, IL-10, IL-13, PGE₂, corticoesteróides e cAMP inibem sua síntese. A produção de IL-1 β pode ter modulação autócrina ou pelo antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). IL-1 β estimula a sua própria liberação e a de IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ , PAF, eicosanóides e fatores de crescimento. Ela induz ativação de neutrófilos, monócitos e linfócitos, a expressão de moléculas de adesão no endotélio, afeta a coagulação sanguínea, induz hipotensão, febre e anorexia.

A compreensão dos mecanismos envolvidos na síntese, secreção e ação da IL-1 β passou por uma enorme revolução nos últimos anos, devido à descoberta dos inflamassomos. Os inflamassomos são complexos proteicos intracelulares, necessários para ativação de caspase-1 e com um papel crítico na regulação de diversos aspectos da resposta imuno-inflamatória (40-47).

IL-12 é produzida por monócitos e células dendríticas. Ela induz produção de IFN γ em células NK e T, sendo um fator de crescimento de células T com efeitos similares aos da IL-2. A IL-12 promove a diferenciação de células T auxiliares (CD4+/CD8-) imaturas Th0 em Th1 e, em sinergismo com a IL-2, induz proliferação de células B e monócitos. Ela age em células T e NK induzindo a liberação de IL-2, IL-3, IL-8, IL-10, TNF α , M-CSF, GM-CSF e IFN γ e inibindo a produção de IL-4. Sua produção é inibida por IL-4, IL-10 e

IL-13. O $\text{IFN}\gamma$ potencializa a síntese da IL-12 e é o mediador de muitos de seus efeitos.

IL-18 é uma citocina estruturalmente similar à IL-1 β e produzida por monócitos/macrófagos. Ela induz produção de IL-2, GM-CSF e $\text{TNF}\alpha$ por células T e inibe a produção de IL-10. A IL-18 induz produção de $\text{TNF}\alpha$ e quimiocinas, além de moléculas de adesão. Ela induz produção de $\text{IFN}\gamma$ por células T e NK. Os níveis séricos de IL-18 estão aumentados em sepse. IL-18 é secretado por macrófagos na forma inativa, sendo ativado pela caspase-1. IL-18 ativado estimula a síntese de $\text{IFN}\gamma$ por linfócitos T e apresenta propriedades semelhantes à citocina pró-inflamatória IL-12.

As citocinas anti-inflamatórias são uma série de moléculas imunorregulatórias que controlam a resposta pró-inflamatória. Dentre elas, podem-se citar IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13. A regulação da resposta inflamatória é complexa, já que o sistema imune apresenta vias redundantes com múltiplos elementos, apresentando efeitos fisiológicos similares. Ademais, com a possível exceção do receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra), todas as citocinas anti-inflamatórias apresentam pró-inflamatórias também (48). O efeito de uma citocina, portanto, depende do momento em que ela foi secretada, do local, da presença ou não de agentes antagonistas e da responsividade do tecido em questão.

IL-1ra é um inibidor específico de IL-1 α e IL-1 β . IL-1ra se liga ao receptor de IL-1 e inibe ativação celular pelos outros componentes desta família. IL-1ra é produzida por monócitos e macrófagos. As citocinas anti-

inflamatórias IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 inibem a síntese de IL-1 β , mas estimulam a de IL-1ra.

IL-4 é uma citocina extremamente pleiotrópica que é capaz de influir na diferenciação de células Th em células Th2, que perpetuam esta polarização de maneira autócrina. Secreção de IL-4 e IL-10 leva à supressão de respostas Th1, por inibição da secreção macrofágica de IL-12. IL-4 é produzida por células Th2, assim como por células de linhagem basofílica e mastocítica, tendo um importante papel em respostas alérgicas. IL-4 é capaz de inibir a secreção monocítica de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8 e MIP-1 (“macrophage inflammatory protein”). IL-4, ainda, é capaz de inibir o “killing” de parasitas e a produção de óxido nítrico por macrófagos. O papel desta citocina em infecções bacterianas é pouco compreendido. Foi demonstrado que IL-4 aumenta o “clearance” de *Pseudomonas aeruginosa* em modelos experimentais de pneumonia e age como um fator de crescimento para *Staphylococcus aureus*, resultando em infecção disseminada.

IL-6 foi, durante muito tempo, vista como uma citocina pró-inflamatória, induzida por LPS e citocinas como TNF α e IL-1 β . IL-6, inclusive, é utilizada com frequência como um marcador de resposta sistêmica pró-inflamatória. IL-6, entretanto, apresenta propriedades pró e anti-inflamatórias. Estudos recentes com camundongos “knockout” para IL-6 demonstraram que seu papel é predominantemente anti-inflamatório. IL-6 inibe a síntese de IL-1 β , TNF α , IFN γ , GM-CSF e MIP-2 (49), tendo pouco efeito sobre citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF β . IL-6 induz síntese de glucocorticóides e promove a síntese de IL-1ra e receptores solúveis de TNF α .

IL-10 é um potente inibidor de citocinas Th1, dentre elas IFN γ e IL-12.

IL-10 é sintetizada por células Th2, monócitos e linfócitos B. IL-10 inibe secreção macrofágica de TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, MIP-1 e MIP-2. Além disso, inibe a expressão celular de MHC-II, moléculas acessórias e CD14. IL-10 inibe, ainda, a produção de citocinas por neutrófilos e células NK, além de promover o “shedding” de receptores de TNF α e inibir a translocação do NF- κ B, após estímulo com LPS. IL-10, em geral, protege o hospedeiro de resposta inflamatória sistêmica induzida por toxinas, mas deixa-o susceptível numa variedade de modelos experimentais de infecção.

IL-11 compartilha diversas características com IL-6, tendo sido descrita, inicialmente, como um fator de crescimento com particular atividade na trombocitopoiese. IL-11 apresenta importantes atividades imunoregulatórias, atenuando a síntese de IL-1 β e TNF α por macrófagos, assim como a de IFN γ e IL-12 por linfócitos T. IL-11 não induz síntese de IL-10, nem de TGF β .

IL-13, um potente modulador *in vitro* da função de monócitos e células B humanas, é secretado por linfócitos T ativados. IL-13 e IL-4 compartilham um receptor comum, o que explica as diversas similaridades entre estas duas citocinas anti-inflamatórias. A principal diferença entre IL-13 e IL-4 é que esta é um mediador central na diferenciação Th2, sua proliferação e atividade, enquanto IL-13 exerce efeitos mínimos na função de linfócitos T (50). IL-13 pode atenuar a produção de TNF α , IL-1 β , IL-8 e MIP-1 por monócitos e exerce um efeito profundo na expressão de moléculas de superfície, tanto em monócitos, quanto em macrófagos. IL-13 estimula a expressão de β 2-integrinas e do MHC-II e inibe ou atenua a expressão do CD14 e de receptores Fc de imunoglobulinas. IL-13 inibe a ativação do NF- κ B em

macrófagos e suprime injúria pulmonar causada por depósito de imunocomplexos (51, 52).

TGF β é sintetizado na sua forma inativa. Existem três isoformas. TGF β é um regulador importante de proliferação celular e de matrix extracelular (53). TGF β induz diferenciação de células escamosas da mucosa brônquica e parece contribuir à fase fibroproliferativa da lesão pulmonar aguda (LPA). Como diversas citocinas, TGF β tem efeitos pró e anti-inflamatórios. Funciona como um “switch” biológico, alterando ou antagonizando a ação de outras citocinas ou fatores de crescimento.

Diversos receptores solúveis de citocinas apresentam propriedades anti-inflamatórias. Os receptores de TNF α dos tipos I e II existem na membrana celular ou como forma solúvel, podendo ser solubilizados para a circulação sistêmica e competir com os receptores de membrana, impedindo, assim, que ocorra ativação celular. Receptores solúveis de IL-1 também podem ser detectado em situações patológicas. IL-18, igualmente, apresenta seu receptor também na forma solúvel (54).

Os membros da superfamília dos receptores de citocinas são ativados por fosforilação de motivos tirosina, pela ação de tirosino-quinases, conhecidas como Janus quinases (JAKs). São recrutadas, em decorrência, proteínas da família dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), que sinalizam a informação recebida para o núcleo celular (55).

Diversas bactérias têm a capacidade de alterar a síntese de citocinas pelo hospedeiro, degradar citocinas pró-inflamatórias ou utilizar receptores solúveis como veículos para invasão celular (56). Veremos esses mecanismos de evasão em maiores detalhes adiante.

Por fim, cabe comentar o papel das mais diversas quimiocinas em sepse. A maior parte das quimiocinas possui quatro cisteínas características e, dependendo do motivo apresentado pelas duas primeiras, são classificadas em uma de quatro classes existentes: CXC ou α , CC ou β , C ou γ e CX3C ou δ . Duas pontes dissulfídicas são formadas entre a primeira e a terceira cisteínas e entre a segunda e a quarta. A única exceção é a linfotactina que tem apenas dois resíduos cisteína. Dezenas de quimiocinas humanas foram identificadas (57), sendo intenso objeto de pesquisa. IL-8, RANTES, MIP-1 e 2, assim como MCP-1 a 4 são alguns exemplos.

As quimiocinas estão implicadas em diversas respostas celulares, que se estendem muito além dos mecanismos de migração de células hematopoiéticas. Tais processos incluem reparo tissular, tráfego de linfócitos, polarização Th1/Th2, angiogênese, inflamação, recrutamento celular, propagação de metástases, desenvolvimento de órgãos linfóides e inflamação (58). As quimiocinas são também secretadas por células endoteliais e moléculas da matrix extracelular, mediando mecanismos de comunicação intercelular (59). Citocinas como IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-17 estimulam, por seus respectivos receptores, a produção das mais diversas quimiocinas (60).

Diversas quimiocinas CXC são produzidas na vigência de um choque séptico. Por exemplo, pacientes com SARA de origem infecciosa têm concentrações significativamente aumentadas de IL-8, ENA-78 e GRO α nos lavados broncoalveolares (61). Um padrão semelhante é obtido, mediante estímulo com LPS (62). Cummings et al. detectaram diminuição de 50% na expressão de membrana de CXCR2, ao estudarem neutrófilos de pacientes

sépticos (63). Utilizando o modelo de CLP, Ness et al. demonstraram que tal diminuição protege os camundongos de lesões inflamatórias, provavelmente, pela diminuição no recrutamento das células responsáveis por esse tipo de dano (64). Por outro lado, MCP-1 demonstrou um papel protetor em sepse, o que nos leva mais uma vez a observar a instabilidade da balança inflamatória nesta doença e a enormidade de fatores que podem influir em sentidos opostos (65).

Em paralelo com a ativação destas respostas efetoras iniciais, o antígeno está sendo degradado e apresentado aos linfócitos T. As moléculas que ativam a imunidade adquirida são, em boa parte, apresentadas por células dendríticas. Células dendríticas imaturas, residindo na periferia, têm uma alta capacidade de endocitose. Elas são ativadas por vários componentes microbianos e exprimem diversos TLRs, como TLR1, 2, 4 e 5. Uma vez ativadas, as células dendríticas migram para os linfonodos, onde apresentam o antígeno às células T. Macrófagos e linfócitos B também são capazes de apresentar antígenos.

Ativação da resposta imune adaptativa requer não somente a apresentação do antígeno pelo complexo humano de histocompatibilidade (MHC) do tipo II, mas também a presença de estímulos acessórios entre as células apresentadoras de antígenos (APC) e os linfócitos T. Os TLRs, presentes nas APCs, assim como outros receptores de reconhecimento de padrões, regulam a expressão destes sinais acessórios, controlando a ativação e a polarização da resposta imune antígeno-específica (66). As citocinas que as APCs e os próprios linfócitos produzem e as características

do antígeno que está sendo apresentado, parecem ser fatores determinantes na polarização do linfócito em célula Th1, Th2, Treg ou Th17 (67, 68).

1.5 Apoptose

Apoptose é um achado comum em sepse e acomete, principalmente, células do sistema imune, particularmente linfócitos B, células dendríticas e linfócitos T CD4+ (69). Algumas bactérias parecem ser capazes de induzir apoptose de células eucarióticas do sistema imune para sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro (70).

Apoptose é relacionada a imunossupressão em sepse. É relatado que LPS e citocinas Th1 inibem apoptose de macrófagos e monócitos (71), enquanto resposta Th2 a estimularia (72). Estudos recentes têm relatado que fagocitose de células apoptóticas estimula tolerância imune, pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, e inibe a expressão de moléculas co-estimulatórias, necessárias para apresentação antigênica. Na presença de células apoptóticas, linfócitos e monócitos produzem significativamente menos citocinas pró-inflamatórias e mais IL-10. Por outro lado, fagocitose de células necróticas causa expressão de moléculas co-estimulatórias e ativação de linfócitos T. Caminhando no mesmo sentido e demonstrando a relevância destes achados em sepse, foi observado aumento na sobrevivência de camundongos *C57Bl/6/J*, quando células esplênicas apoptóticas são injectadas nestes animais 5 dias antes de serem submetidos a punção e ligadura cecal (CLP). Quando células necróticas são injectadas, entretanto, ocorre o oposto, ou seja, a mortalidade aumenta (73). O modelo de CLP ocasiona intensa morte de linfócitos B por apoptose. Inibição da morte celular

deste tipo celular, utilizando-se um inibidor de caspase, aumentou a sobrevivência de camundongos submetidos a CLP (74).

Para uma aprofundada revisão sobre morte celular em sepse, sugiro a leitura de um artigo de revisão que publiquei em 2009 (69).

O presente projeto pretende investigar de maneira ampla os mecanismos de resposta imuno-inflamatória em sepse. No entanto, uma atenção especial será dada a duas famílias de proteínas: os Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) e os Receptores Fc de Imunoglobulinas (FcRs). Desta forma, estas duas famílias serão descritas em maiores detalhes.

2 Peptídeos antimicrobianos

2.1 Conceitos gerais

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) foram identificados em vertebrados, insetos e plantas e são importantes mecanismos de defesa contra a infecção por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, infecções virais e fúngicas. As catelicidinas são um grupo de AMPs que contêm um pró-peptídeo no segmento N-terminal (cathelin) e um domínio C-terminal com propriedades bactericidas. Em mamíferos, catelicidinas são uma classe importante de AMPs, sendo produzidas por células epiteliais e fagócitos. Humanos e camundongos produzem apenas uma única catelicidina, nomeadas de LL-37 e CRAMP, respectivamente. Os peptídeos antimicrobianos foram descritos, inicialmente, como “antibióticos naturais”, devido à sua capacidade de inserção na membrana celular de micro-organismos, causando lise celular. Nos últimos anos, entretanto, surgiram diversas publicações descrevendo funções imunoregulatórias para os mais diversos AMPs, além da clássica função bactericida (**Figura 2**).

Figura 2 - Os diversos efeitos da catelicidina LL-37

A maioria dos AMPs são catiônicos e esta característica facilita a sua inserção na parede celular, promovendo morte bacteriana por lise celular (**Figura 3**). As catelicidinas LL-37 e CRAMP, ademais, são capazes de exercer efeitos biológicos adicionais sobre fagócitos, células epiteliais e endoteliais, induzir quimiotaxia, supressão da resposta inflamatória induzida por LPS, apoptose, angiogênese, reparo tecidual e processamento de IL-1 β . A vitamina D induz potente expressão gênica de LL-37.

Figura 3 - Como peptídeos antimicrobianos são catiônicos e a membrana celular das bactérias é aniônica, os AMPs conseguem lisar este tipo de célula com facilidade

2.2 Vitamina D e imunidade

A vitamina D tem um papel bem estabelecido na homeostasia óssea e do cálcio. Estudos recentes, entretanto, têm atribuído uma importância crescente da vitamina D na imunidade inata. Vitamina D3 pode ser produzida por exposição da pele a raios ultra-violeta (UVB) ou pode ser ingerida em certos alimentos. Na pele, 7-dihidrocolesterol é convertido em vitamina D3 ou coledalciferol, sendo então convertido no fígado, pela enzima 25-hidroxilase, em 25-hidroxicolecalciferol. Nos rins, por fim, ocorre sua conversão pela enzima 1α -hidroxilase para a forma ativa, o 1,25-

dihidroxicolecalciferol. Este último passo pode ocorrer também em queratinócitos, em resposta à infecção ou injúria, por ação da enzima CYP27B1 (75). 1,25-dihidroxicolecalciferol aumenta a absorção enteral e renal de cálcio, além de estimular osteoblastos (76). Ademais, a vitamina D induz a produção de catelicidinas e aumento na expressão celular de CD14 e receptores *toll-like*.

2.3 Translocação nuclear de catelicidinas

Figura 4 - Modelo estrutural de catelicidina, obtido por cristalografia

Os mecanismos responsáveis pelas funções imunomoduladoras dos peptídeos antimicrobianos ainda são obscuros (**Figura 4**).

Em experimentos realizados na Universidade de San Diego (UCSD), em macrófagos murinos infectados com *S. aureus*, pude observar

translocação de CRAMP para o

núcleo celular, sugerindo que esta molécula pode agir também como um ativador ou repressor de transcrição gênica, ou até mesmo como um estabilizador de complexos proteicos.

Comecei tais experimentos nos EUA em outubro de 2007, estudando o efeito de diferentes ligantes na sinalização inflamatória de macrófagos de selvagens e deficientes em CRAMP. Inicialmente, detectei efeitos discrepantes quando comparamos células estimuladas por CRAMP de origem exógena ou endógena. Na verdade, apesar das catelicidinas de origem

exógena inibirem sinalização TLR4-dependente induzida por LPS, detectei um aumento na fosforilação de p38 em células murinas deficientes em CRAMP, após estímulo com LPS. Este resultado levou-me à hipótese de que CRAMP de origem exógena danifica a membrana celular e aborta sinalização por TLRs, pela indução de canais iônicos (**Figura 5**). Mais completa análise bioquímica, resultou na observação de que as catelicidinas afetam criticamente o recrutamento de MyD88 e a sua interação com IRAK-4 (77).

Estes resultados mostram que CRAMP amplifica a resposta induzida por LPS e que CRAMP pode induzir a ativação ou inibição da sinalização por MAPK, dependendo do estado basal da célula (77). Ademais, CRAMP foi capaz de amplificar a expressão gênica de TNF α e IL-1 β *in vitro*, após infecção por *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. anthracis* e *E. Coli* (dados não publicados).

Essas descobertas levaram-me a postular que as catelicidinas podem modular a resposta imune em diferentes níveis. Fiz, assim, a hipótese de que, além de seus efeitos sobre a membrana celular, catelicidinas seriam translocadas para o núcleo após infecção bacteriana, a fim de agir como um co-ativador de NF- κ B. Suportando esta ideia, existe publicação de 2007 demonstrando que LL-37 se liga a DNA bacteriano e autólogo, agindo como uma opsonina para TLR-9 (78). Fenômeno semelhante é observado em neutrófilos de pacientes lúpicos (79). Esse tipo de ligação, entretanto, é observada no citosol e meio extra-celular. A translocação nuclear de catelicidinas nunca antes havia sido aventada. Em 2008, realizei experimento nos EUA que demonstrou co-localização de CRAMP e DAPI, uma coloração específica para núcleo celular, confirmando assim a minha hipótese.

Figura 5 - Mecanismos celulares deflagrados por LL-37 (Pinheiro da Silva et al., *Tissue and Cell* 2013)

2.4 Peptídeos antimicrobianos: aspectos moleculares e evolução

A produção de peptídeos antimicrobianos é um dos componentes principais na resposta a uma infecção. Sua produção pode ser constitutiva ou induzida, dependendo de uma gama de características, tais como organismo, tipo celular e peptídeo em questão. Peptídeos antimicrobianos são geralmente anfipáticos, pequenos (15-50 aminoácidos) e apresentam ao menos duas cargas positivas (tais como arginina e lisina). Tais propriedades químicas permitem que se inseriram na parede celular e membrana fosfolipídica de diversos microrganismos, lisando assim tais células. Até o

presente momento, mais de 1200 peptídeos antimicrobianos foram descritos (80).

Humanos e outros animais estão em contato constante com microrganismos e suas superfícies mucosas são colonizadas por uma complexa microbiota (81, 82).

Em humanos e outros mamíferos, células de Paneth são uma importante fonte intestinal de peptídeos antimicrobianos (83-85). Vertebrados inferiores possuem células secretórias que parecem funcionar de maneira semelhante (86). Células de Paneth são células secretórias localizadas no epitélio do intestino delgado, contendo grandes grânulos com uma ampla variedade de proteínas. As proteínas mais abundantes nestes grânulos são os peptídeos antimicrobianos, especialmente as α -defensinas (87). Diversos outros tipos celulares, entretanto, tais como queratinócitos e células epiteliais dos pulmões, produzem AMPs para proteger as superfícies mucosas. Além disso, AMPs são produzidos por células que circulam na corrente sanguínea, tais como monócitos e neutrófilos.

A imunidade inata se apoia no reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno e no processo de fagocitose para iniciar a defesa do hospedeiro. O sistema de imunidade inata possibilita defesa imediata contra infecção, sendo o principal mecanismo de defesa em plantas, fungos, invertebrados e protocordados. Peptídeos antimicrobianos são um componente evolutivamente conservado da imunidade inata, sendo encontrados em todos os seres vivos. Peptídeos antimicrobianos, tais como

as defensinas e as cecropinas, são produzidos por várias espécies de insetos e representam a principal forma de imunidade sistêmica de invertebrados.

Assim como os invertebrados, as plantas são incapazes de produzir anticorpos e resposta T-mediada (88). Plantas utilizam receptores de reconhecimento de padrões para reconhecer assinaturas microbianas. Tais proteínas contêm domínios semelhantes a NOD e receptores *Toll-like*. Mecanismos de silenciamento de RNA também são importantes na resposta sistêmica de plantas e podem bloquear replicação viral.

Apesar de insetos não apresentarem respostas imunes antígeno-específicas, insetos apresentam imunidade celular e humoral. As respostas imunes celulares incluem fagocitose, nodulação e encapsulação. A produção de peptídeos antimicrobianos é parte da imunidade humoral.

Nas últimas duas décadas, diversos AMPs foram isolados de insetos e plantas (89-91). A maior parte dos AMPs produzidos por insetos podem ser divididos em dois grupos: AMPs induzíveis que são secretados na vigência de infecção e os AMPs constitutivos que estão sempre presentes na hemolinfa. Mais de 250 AMPs foram descritos em insetos, desde o primeiro relato pelo grupo de Boman (92).

Os mecanismos moleculares dos peptídeos antimicrobianos em insetos foram estudados, principalmente, em *Drosophila*. Defensinas demonstraram atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas. Cecropina, drosocina, attacina, diptericina e MPAC (o pró-domínio da attacina C)

apresentaram atividade microbicida contra bactérias gram-negativas.

Drosomicina e metchnikowina apresentaram atividade antifúngica.

As cecropinas são sintetizadas como pró-peptídeos de 63 aminoácidos, com um peptídeo sinal de 23 resíduos, seguidos pela cecropina madura (40 resíduos). Drosocina, um AMP com atividade microbicida contra germes gram-negativos, é produzida como um pró-peptídeo de 64 aminoácidos. A Diptericina é produzida como um pró-peptídeo de 106 aminoácidos (peptídeo sinal com 23 resíduos). Análogos da attacina possuem mais de 190 aminoácidos de comprimento, sendo os maiores AMPs já descritos. MPAC (pró-domínio maduro da attacina C) é sintetizado como um pró-peptídeo de 241 aminoácidos, contendo um peptídeo sinal de 23 resíduos. Drosomicina, um AMP com atividade antifúngica, é sintetizado como um pró-peptídeo de 70 resíduos (peptídeo sinal de 26 aminoácidos). Metchnikowina é sintetizada como pró-peptídeos de 52 resíduos, contendo peptídeo sinal de 26 aminoácidos.

Após a ligação de Spatzle ao receptor Toll, a produção de AMPs é induzida pelo corpo gorduroso ("fat bodies") (93). O complex Spatzle-Toll recruta a expressão de diversos genes, incluindo peptídeos antimicrobianos.

Insetos não possuem imunidade adaptativa. Entretanto, estudos recentes em mosquitos e moscas identificaram diversos receptores imunes em invertebrados (94, 95), desvendando um inesperado alto grau de especificidade e memória imunológica nestes seres vivos (96).

AMPs podem ser divididos em quatro categorias: 1) peptídeos em α -hélices; 2) estruturas em β -sheets, estabilizados por pontes dissulfídicas; 3) estruturas extendidas e 4) em forma de loop. Na maioria dos casos, os AMPs agem em grupos de maneira sinérgica. Uma miríade de peptídeos antimicrobianos já foram descritos em peixes, anfíbios e mamíferos (97). Estes incluem as catelicidinas, as defensinas, a hepcidina, a tiginina-1, a batenecina, a protegrina-1, as breveninas e diversos outros.

Em mamíferos, os peptídeos antimicrobianos são expressos por uma variedade de tipos celulares, incluindo monócitos, neutrófilos, células epiteliais, queratinócitos e mastócitos. Enquanto alguns são expressos constitutivamente, outros necessitam de estímulo infeccioso ou inflamatório para serem induzidos.

Defensinas são uma família composta por mais de 100 AMPs, produzidos por leucócitos e células epiteliais de pássaros e mamíferos. Constituem mais de 5% do conteúdo proteico celular dos neutrófilos humanos (98). As defensinas dos vertebrados podem ser divididas em α - e β -defensinas, dependendo da estrutura do gene e conectividade dos seus resíduos cisteína. As seis cisteínas nas α -defensinas são ligadas em um padrão 1-6, 2-4 e 3-5, enquanto que as β -defensinas mantêm um padrão 1-5, 2-4 e 3-6. Defensinas contêm 29-35 aminoácidos, incluindo seis cisteínas em posição fixa que formam três pontes dissulfídicas. As α -defensinas estão presentes nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, em certas populações de macrófagos, em células de Paneth e no trato genital feminino. As β -defensinas estão presentes em células epiteliais, incluindo trato

genitourinário, pele e trato respiratório, assim como em granulócitos.

Neutrófilos humanos, de coelho, ratos e porquinhos-da-índia contêm grandes quantidades de defensinas. Defensinas não são encontradas em células polimorfonucleares murinas (99).

Em humanos, quatro α -defensinas foram isoladas em neutrófilos (HNP-1 to 4). HNP-1 a 3 são também encontradas em células B e natural killer. Duas defensinas (HD5 e 6) são conhecidas como defensinas entéricas, sendo encontradas em grânulos de Paneth do intestino delgado e em células epiteliais do trato genital feminino. Os genes para todas as seis α -defensinas são encontrados na mesma região do cromossomo 8. α e β -defensinas são efetivas contra diversas bactérias, fungos e alguns vírus. Em células de Paneth e neutrófilos, a expressão de α -defensinas é constitutiva. Defensinas também apresentam propriedades quimiotáticas e citotóxicas contra uma ampla gama de alvos celulares. Estudos *in vitro* com defensinas humanas têm demonstrado que elas podem estimular proliferação celular e produção de citocinas por células CD4+, assim como modular a expressão de moléculas co-estimulatórias (100). Defensinas são ativadas por processamento proteolítico. Os genes para todas as seis β -defensinas humanas estão localizados na região 8p23. β -defensinas são expressas por diversos tipos de células epiteliais e a expressão no epitélio intestinal é induzível, exceto para a β -defensina humana 1 (hBD-1).

A β -defensina humana 2 (hBD-2) é induzida por produtos bacterianos e citocinas pró-inflamatórias. Infecção das linhagens celulares intestinais Caco-2 e HT-29 com *C. jejuni*, por exemplo, induz expressão de hBD-2. Tratamento

com IL-1 β ou TNF α induz a síntese de hBD-2 por queratinócitos, células da epiderme, pulmão, útero, gengiva, intestino e ouvido médio. hBD-2 é induzida em células epiteliais, leucócitos e medula óssea.

β -defensina humana 3 (hBD-3) é induzida no estômago, durante infecção por *Helicobacter pylori* (101). Queratinócitos infectados por *S. aureus* também estimulam secreção de hBD-3. A pele e as tonsilas são importantes produtores de hBD-3.

A regulação da síntese de hBD-1 e hBD-4 é menos compreendida. A regulação de hBD-1 é principalmente constitutiva e ocorre em células epiteliais. A expressão de hBD-4 pode ser induzida por cálcio, TNF α , IL-1 β e PMA em queratinócitos. hBD-4 e 6 são expressas no epidídimo. hBD-1 e 2 são potentes agentes contra bactérias gram-negativas. hBD-3 é um peptídeo antimicrobiano de amplo espectro.

Em células mononucleares do sangue periférico, hBD-1 e hBD-2 são potentes indutores de citocinas. hBD-3 e hBD-4 induzem quimiotaxia e degranulação de mastócitos humanos e de ratos, assim como fosforilação de ERK e p38. hBD-2 apresenta atividade quimiotática em mastócitos (102).

Durante a evolução, genes que codificam defensinas sofreram duplicação e diversificação, ocorrendo alterações nas suas sequências primárias que podem ser atribuídos a pressões seletivas (103), fato que resultou em alto grau de variação. Camundongos, por exemplo, codificam 19 β -defensinas.

Enquanto as α e as β -defensinas são os AMPs mais abundantes em mamíferos, diversos AMPs lineares formando α -hélices e pertencendo à família das catelicidinas também são produzidos. Catelicidinas possuem um segmento pró-peptídeo N-terminal bem conservado, conhecido como domínio catelina, assim como um domínio C-terminal, com propriedades antimicrobianas. Em humanos, esta proteína precursora é chamada hCAP18, devido à sua massa de 18 KDa. A proteína é processada para liberar da porção C-terminal, uma proteína de 37 aminoácidos que apresenta duas leucinas na sua extremidade e foi nomeada LL-37. Seu processamento é realizado por proteases de serinas, presentes em queratinócitos, tais como as calicreínas, assim como por proteases presentes em neutrófilos, tais como a proteinase 3.

Catelicidinas foram identificadas em diversas espécies de mamíferos. Em camundongos e humanos, somente um gene para catelicidina foi identificado (*CAMP*), induzindo uma proteína chamada, respectivamente, CRAMP e LL-37. LL-37 é expressa por leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos, mastócitos, células NK, células B e $\gamma\delta$ T. LL-37 também pode ser isolado no plasma, medula óssea, trato respiratório, intestino, glândulas mamárias, epidídimo e pele. Células epiteliais do trato urinário em humanos e camundongos, ademais, produzem catelicidinas (104) e efeitos no desenvolvimento intestinal foram relacionados à expressão de CRAMP, já que a síntese deste peptídeo no intestino parece ser limitada às primeiras duas semanas após o nascimento, sugerindo sua participação na colonização bacteriana e estabelecimento de homeostase intestinal (105).

do grupo A, desenvolveram áreas de infecção na pele significativamente maiores do que camundongos selvagens, demonstrando que a ação das catelicidinas é importante na resposta imune contra este patógeno (106, 107).

LL-37, assim como as β -defensinas, induzem fosforilação de MAPKs em monócitos humanos derivados do sangue periférico (108). Fosforilação mediada por LL-37, em algumas situações, depende do receptor FPRL1 (G protein-coupled formyl peptide-like receptor 1) (109). Efeitos antagônicos induzidos por CRAMP endógeno e exógeno, foram observados pelo nosso grupo (77). Ainda permanecem obscuros na literatura, os mecanismos pelos quais AMPs são capazes de induzir sinalização celular. Diferentes modelos foram propostos, incluindo ligação direta a receptores, tais quais o FPRL1, o P2X7 (110) o CXCR2 (111), o receptor de EGF (epidermal growth factor receptor), dentre outros (112, 113). Nós acreditamos que, nos níveis em que é usualmente utilizado para ensaios *in vitro*, CRAMP é citotóxico. Nestas condições, acaba sendo artificialmente inibitório. Por outro lado, estudos *in vivo* demonstram que seu verdadeiro papel é como ativador de respostas imunes (77). Este efeito, em parte, provavelmente é receptor-independente e deve ser induzido pela formação de pequenos poros na membrana celular eucariótica, causando fluxos iônicos que afetam sinalização intra-celular (114-116). O mesmo efeito deve ocorrer, quando este se liga ao receptor P2X7 e receptores similares. Com efeito, já foi demonstrado que α -defensinas induzem canais iônicos em células epiteliais (82, 117). Interessante, também

foi demonstrado que LL-37 é capaz de se ligar a DNA e deflagrar sinalização via *toll-like receptor* 9 (78), assim como se ligar a RNA, ativando células dendríticas via TLR7 e TLR8 (118).

O receptor de vitamina D (VDR) é expresso em macrófagos, linfócitos T, células B e neutrófilos (119, 120). A maior parte destes tipos celulares é capaz de converter vitamina D à sua forma ativa. Não há clara evidência, entretanto, que neutrófilos expressem CYP27B1 e, portanto, acredita-se que neutrófilos devem responder somente à vitamina D na sua forma ativa.

Indução na produção de catelicidinas pela vitamina D é um fenômeno observado em humanos e primatas. Não-primatas, tais como camundongos, não produzem catelicidinas em resposta à vitamina D. VDRE também foi detectado na região promotora da DEFB2, porém sua indução por vitamina D é mais modesta (121). Experimentos realizados por Gombart et al. demonstraram que o gene produtor de catelicidina responsivo ao VDRE se originou em uma linhagem de primatas, ao menos, há 55 milhões de anos (122).

Peptídeos antimicrobianos apresentam uma plethora de funções que podem ser exploradas no diagnóstico e tratamento de doenças complexas (123). CAMP é induzido de maneira potente em queratinócitos humanos, durante cicatrização epitelial, provavelmente para estimular re-epitelização (113, 124, 125). De maneira similar, peptídeos antimicrobianos são essenciais na manutenção da integridade do epitélio pulmonar (126).

A expressão de AMPs está diminuída na dermatite atópica, levando a taxas aumentadas de infecção (127). Por outro lado, sua expressão está

aumentada em outras doenças dermatológicas, tais como psoríase e rosácea, situações onde suas propriedades pró-inflamatórias podem ser deletérias (128). Tais exemplos demonstram como a indução ou supressão da produção de AMPs pode ser usada no tratamento de auto-imunidade ou inflamação.

Diversos estudos interessantes, ademais, têm associado polimorfismos e variação no número de cópias de genes codificadores de β -defensinas (129), com condições tais como pancreatite (130), infertilidade (131), psoríase (132) e doença de Crohn (133).

LL-37 é capaz de se ligar a LPS e suprimir sua interação com LBP, assim como se ligar ao CD14, inibindo assim a secreção de TNF α induzida por LPS. Em modelo experimental de endotoxemia, LL-37 diminuiu a mortalidade de ratos (134).

Camundongos deficientes em CRAMP são mais sensíveis a infecções por estreptococo (107) e camundongos deficientes em β -defensina apresentam susceptibilidade aumentada a infecções estafilocócicas (135).

As bactérias desenvolveram diversas estratégias para escapar do ataque por peptídeos antimicrobianos. Diversas cepas de estreptococos do grupo A, por exemplo, secretam uma proteína chamada SIC (streptococcal inhibitor of complement), que se liga e inibe as propriedades microbicidas de HNP-1, hBD-1, -2 e -3. *S. agalactiae* (estreptococo do grupo B) produz PBP1a, um fator de virulência capaz de induzir resistência a HNP-1 e outros AMPs. Diversas bactérias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella spp.* produzem proteases capazes de clivar AMPs.

2.5 Peptídeos antimicrobianos e câncer

LL-37 está diretamente envolvido no recrutamento de células pluripotentes mesenquimais (MSC) por tumores e estimula a liberação de moléculas, tais como IL-6, IL-10, MMP-2 e VEGF pelas MSCs. Diversos esforços têm sido realizados para se entender as implicações clínicas da conexão catelicidina-vitamina D em câncer. Vitamina D induz uma miríade de mecanismos, tais como apoptose, reparo de DNA, efeitos antioxidantes e imunomodulação que devem afetar o crescimento tumoral. Ação em células do estroma, células endoteliais e imunes devem também contribuir para o papel da vitamina D na carcinogênese (95).

Vitamina D tem um efeito protetor *in vitro* em queratinócitos contra radiação ionizante (136). Camundongos deficientes em VDR são mais sensíveis a carcinógenos, desenvolvendo maiores tumores do que camundongos selvagens (137).

A associação entre vitamina D e AMPs em câncer, no entanto, permanece obscura. Com efeito, vitamina D e catelicidinas apresentam resultados discrepantes em câncer. A expressão de LL-37 se encontra aumentada em câncer de mama. Superexpressão de LL-37 em células de câncer de mama promove desenvolvimento de metástases em camundongos SCID (138, 139), além de um comportamento mais agressivo, devido à sua interação com FPRL1 (139). LL-37 promove crescimento tumoral em um modelo de xenotransplante de câncer de pulmão (140). Por outro lado, LL-37 é pouco expresso em pólipos gástricos, adenomas tubulares e adenocarcinomas (141) e regula negativamente o crescimento de câncer

gástrico. De maneira intrigante, apesar de induzir a produção de catelicidinas, um número de estudos sugerem que a vitamina D pode estar associada com menor incidência de câncer de mama (142) e pulmões (143), mas não com câncer gástrico (143, 144). Este paradoxo sugere que os efeitos de LL-37 na biologia do câncer não são simples consequência do seu estímulo pela vitamina D. Outras vias de sinalização certamente estão envolvidas. Com efeito, stress do retículo endoplasmático aumenta a expressão de CAMP via ativação de NF- κ B-C/EBP α em células epiteliais, independentemente do VDR (145).

Peptídeos antimicrobianos têm sido estudados como novos agentes terapêuticos para tratamento de cancer (146, 147). Peptídeos antimicrobianos devem ter um efeito na biologia do câncer, devido a seus efeitos citotóxicos, assim como devido às suas funções imunoregulatórias, incluindo efeitos na diferenciação celular, proliferação, angiogênese e inflamação.

Muitos pesquisadores acreditam que certos AMPs apresentam seletividade para membranas microbianas. Diversos estudos, entretanto, têm demonstrado que em concentrações elevadas, células como os linfócitos T também são destruídas. Tais estudos suportam um importante papel destes peptídeos em câncer (148).

Camundongos deficientes em catelicidinas apresentam crescimento tumoral mais acelerado que controles selvagens e células NK destes animais deficientes apresentam atividade citotóxica alterada (149).

AMPs, portanto, apresentam um grande potencial para o tratamento e diagnóstico de doenças complexas. AMPs podem ser explorados para a

geração de novos antibióticos, manipulação do processo inflamatório, reparo cicatricial, em doenças auto-imunes e no combate a tumores.

3 Receptores Fc de Imunoglobulinas

3.1 Conceitos gerais

Para que ocorra uma resposta aos mais variados antígenos, as células B e T rearranjam os genes que codificam suas imunoglobulinas e receptores de células T, para gerar mais de 10^{11} diferentes receptores de antígenos. O reconhecimento de determinado antígeno pelo seu receptor específico, desta forma, deflagra expansão clonal dos linfócitos e posterior produção de anticorpos antígeno-específicos. Esse sistema sofisticado é observado somente em vertebrados, sendo uma potente defesa contra infecção microbiana.

A interação antígeno-anticorpo é reconhecida na superfície celular por uma classe de glicoproteínas de membrana, pertencentes à superfamília das imunoglobulinas e chamadas de receptores Fc de imunoglobulinas. A interação entre anticorpo e FcR propicia o reconhecimento do antígeno pelas células que apresentam aquele determinado FcR. Tal interação resulta numa série de respostas celulares, dentre as quais, apresentação de antígenos, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), degranulação, fagocitose, endocitose, transcitose e desencadeamento de cascatas de sinalização celular, que culminam na liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (**Figura 6**). Todas essas interações são iniciadas pela ligação da porção Fc de anticorpos ou imunocomplexos a estes receptores (150).

Figura 6 - Mecanismos deflagrados por receptores Fc de imunoglobulinas

Existem receptores Fc de alta e de baixa afinidade. Os de alta afinidade podem ligar imunoglobulinas monoméricas não-complexadas. Imunoglobulinas monoméricas se ligam a esses receptores com afinidades constantes na ordem de 10^8 M^{-1} para FcγRs de macrófagos e $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ para FcαRs de monócitos. FcRs de baixa afinidade não ligam imunoglobulina monomérica com afinidade mensurável. Ligam, entretanto, imunoglobulinas agregadas ou anticorpos complexados com antígenos multivalentes com uma alta avidéz. FcRs de alta e baixa afinidade deflagram resposta celular com igual eficácia. A diferença está na ordem dos eventos. As imunoglobulinas

monoméricas se ligam aos de alta afinidade antes de serem complexadas pela ligação a um antígeno multivalente. Os anticorpos precisam, por outro lado, formar imunocomplexos com os antígenos, antes de se ligarem aos FcRs de baixa afinidade. FcRs existem como receptores de membrana e na forma solúvel.

Mais recentemente, começou a ser caracterizado que, além das funções ativadoras, os FcRs iniciam também sinalização inibitória (151). Está bem esclarecido que a variabilidade das respostas celulares resulta da heterogeneidade estrutural de tais receptores. Um grande progresso vem ocorrendo, na compreensão da importância do balanço das respostas ativadoras pelas inibitórias, e vice-versa (152). Modelos animais nos quais essa resposta inibitória foi deletada, desencadearam respostas efectoras exacerbadas, tanto por citotoxicidade, como mediada por imunocomplexos (152-155).

Os receptores Fc são definidos pela sua especificidade por isótipos de imunoglobulinas. Receptores Fc de IgG são chamados FcγR; de IgE, FcεR; de IgA, FcαR; de IgD, FcδR e de IgM, FcμR. No presente trabalho, discutiremos principalmente o papel dos receptores de IgG e IgA em sepse.

3.2 Receptores de IgG

Atualmente, conhecemos três grupos de receptores de IgG (FcγRs), designados FcγRI, FcγRII e FcγRIII. Receptores estruturalmente relacionados, mas codificados por genes distintos, são chamados por letras maiúsculas (A, B, C, etc). Em humanos, além do FcγRI, encontramos três genes homólogos para o FcγRII (FcγRIIA, FcγRIIB e FcγRIIC) e dois para o

FcγRIII (FcγRIIIA e FcγRIIIB). Em camundongos, é importante ressaltar que, além do FcγRI, um único gene codifica o FcγRII, assim como um outro, o FcγRIII, não existindo diferentes homólogos para nenhuma dessas sub-classes.

FcγRI (CD64) é um receptor de alta afinidade para IgG, presente em monócitos e macrófagos(155). Sua expressão pode ser induzida em neutrófilos humanos por IFN-γ. Diferentemente dos demais receptores para IgG, o FcγRI contém três domínios extra-celulares. FcγRI medeia ADCC, fagocitose, produção de espécies reativas do oxigênio e secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

FcγRII (CD32) é um receptor de baixa afinidade, sendo o mais largamente distribuído (156). É encontrado em células dendríticas, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, macrófagos, monócitos, plaquetas, linfócitos B e células pluripotenciais. Não é encontrado em células NK. Em humanos, além das células NK, também não é encontrado em células T, apesar de ter sido caracterizado em células T murinas. Todos os homólogos humanos (IIA, IIB e IIC) apresentam dois domínios extra-celulares praticamente idênticos. A diferença se encontra nos domínios intra-citoplasmáticos. FcγRIIB, entretanto, é o único receptor de IgG deste grupo encontrado em camundongos. O FcγRIIB murino apresenta duas isoformas: b1 e b2. Tais isoformas são originadas por “splicing” alternativo dos exons que codificam o fragmento citoplasmático. A isoforma b1 é expressa, preferencialmente, em linfócitos; a b2, em macrófagos. Em humanos, além dessas duas isoformas do FcγRIIB,

foram também identificadas uma terceira isoforma de FcγRIIB (b3), assim como duas isoformas do FcγRIIA (a1 e a2) (156, 157).

FcγRIII (CD16) é um receptor de baixa afinidade, com dois domínios extracelulares semelhantes ao FcγRII. Em humanos, encontramos dois homólogos. FcγRIIIA é o único FcR em células NK, mediando ADCC. É encontrado também em macrófagos, neutrófilos e precursores mielóides, sendo o único FcγRIII encontrado em camundongos. Camundongos “knockout” para o FcγRIII mostraram incapacidade de degranular, quando estimulados por imunocomplexos, assim como se mostraram incapazes de desenvolver reação de Arthus, revelando um papel primordial deste receptor no desenvolvimento de reações de hipersensibilidade do tipo III (158). Com a demonstração de que camundongos deficientes em C3, C4 ou C5 desenvolvem uma reação de Arthus normal (159), os receptores Fc devem ser vistos como suficientes e indispensáveis para que esse tipo de resposta ocorra. FcγRIIIB, por sua vez, é um receptor Fc atípico. Encontrado em neutrófilos humanos, permanece ancorado à membrana celular por uma ligação glicosil-fosfatidil-inositol (GPI).

3.3 Receptores de IgA

A família dos receptores de IgA compreende diversos receptores, a saber, o receptor polimérico de imunoglobulinas, envolvido no transporte epitelial de IgA e IgM; o receptor específico de IgA (FcαRI); o recém-descrito Fcα/μR (160) e, pelo menos, mais dois receptores alternativos (o receptor de transferrina e o receptor de asialoglicoproteína) (161).

O Fc α RI (CD89) é composto de dois domínios extra-celulares, uma região transmembrana e uma cauda intra-citoplasmática. Este receptor se encontra, em geral, associado à cadeia gama dos receptores Fc (FcR γ). Pode ser também encontrado na membrana celular sem cadeia gama, porém esta forma não-associada é incapaz de ativar cascatas de sinalização intra-celular, tendo apenas um papel na endocitose de IgA, provavelmente relacionado à reciclagem dessa proteína. O local de ligação do Fc α RI é no domínio distal (EC1), ao contrário do que ocorre com os outros receptores Fc que apresentam dois domínios extra-celulares (Fc γ RI e Fc ϵ RI), nos quais o local de ligação se localiza no domínio proximal (EC2). Fc α RI é um receptor de baixa afinidade para IgA e apresenta glicosilação heterogênea, dependendo da célula em que se encontra expresso, o que faz seu peso molecular oscilar entre 50 e 100 kDa. A expressão do Fc α RI é constitutiva e ele somente é expresso por células humanas, estando ausente em células murinas (162). Se a IgA murina se liga ou não ao Fc α RI, é um assunto ainda controverso. Camundongos transgênicos para tal receptor desenvolvem espontaneamente nefropatia por IgA, após seis meses de vida, o que suporta a ligação da IgA desses animais ao CD89 (163).

Fc α RI (CD89) é expresso em neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e de Kupffer. Esse receptor se liga tanto à IgA1, quanto à IgA2. Ao contrário dos complexos 1:1 do Fc γ RIII com o fragmento Fc da IgG e do Fc ϵ RI com a IgE, duas moléculas do Fc α RI ligam cada dímero de Fc α , um em cada junção Ca2-Ca3 (164, 165). A IgA1 difere da IgA2, basicamente, pela ausência de 13 aminoácidos na região de

forquilha da IgA2, o que acarreta diferenças de glicosilação entre as duas subclasses. Tal diferença explica a resistência da IgA2 a diversas proteases bacterianas (166). Em humanos, a IgA sérica é predominantemente monomérica, produzida por linfócitos B na medula óssea e órgãos linfóides periféricos e constituída de IgA1, enquanto a IgA2 predomina nas secreções mucosas. A IgA nas mucosas é produzida localmente, por plasmócitos, quase que exclusivamente como dímeros, unidos por um peptídeo denominado cadeia J. Permanece ligada ao componente secretório, que é um fragmento do receptor polimérico de imunoglobulinas, o receptor responsável pelo transporte da IgA para o lúmen das mucosas. O conjunto dímero de IgA, cadeia J e componente secretório constituem a denominada IgA secretória (SIgA). O componente secretório se estende em espiral, em torno do fragmento Fc, protegendo-o assim da ação de proteases endógenas. Em camundongos, por outro lado, a IgA sérica é predominantemente polimérica, apresenta uma única classe e não há compartimentalização tão demarcada entre o ambiente sérico e o das mucosas. Em humanos, IgA é a imunoglobulina produzida de maneira mais abundante, havendo uma produção diária de 66 mg/kg (167). No soro, entretanto, IgA constitui um quinto do “pool” total de imunoglobulinas, devido ao seu alto catabolismo (meia-vida de 3 a 6 dias).

A superfície mucosa está em contato permanente com diversas cepas de bactérias e outros microrganismos. Mais de 70% das células imunes são mobilizadas diariamente para impedir infecções sistêmicas. SIgA tem participação importante na prevenção contra a invasão de agentes e

proteínas, além de neutralizar toxinas e diversos microrganismos (mecanismo de exclusão bacteriana, caracterizado por aglutinação do antígeno pelo anticorpo, aumentando sua eliminação no muco, neutralizando toxinas e a fixação à parede mucosa). Ademais, outro mecanismo de defesa nas mucosas é a eliminação imune, por meio da qual bactérias que conseguem atravessar essa barreira são retransportadas para a luz intestinal, por um mecanismo de transcitose, do qual não participa a SIgA, mas sim IgA e IgM poliméricas antígeno-específicas. Além da transcitose, anticorpos podem se difundir do sangue para a luz intestinal, quando a permeabilidade das mucosas aumenta por inflamação local ou simples dilatação. Especificidade antigênica também é a principal responsável pela atividade antimicrobiana da SIgA, mas a glicosilação desta proteína também deve contribuir significativamente, já que fragmentos de oligossacarídeos de IgA1 e IgA2 podem se ligar a lecitinas comuns a diversas bactérias (168). As células de Kupffer e as células dendríticas, por sua vez, parecem ter um papel importante como segunda linha de defesa, quando a barreira mucosa foi definitivamente vencida. A inabilidade da SIgA em fixar complemento parece ser uma vantagem no lúmen, onde uma reação inflamatória iria prejudicar esse importante sistema de defesa, ou seja, a integridade das mucosas (161, 169). Existe, igualmente, outros isótipos de anticorpos nas secreções. IgM, entretanto, é pouco abundante e muito sensível a proteases, enquanto IgG prevalece sob a forma de fragmento Fab. Tais anticorpos, conhecidos conjuntamente como anticorpos naturais (170-173), existem antes de qualquer estimulação antigênica. São moléculas pluri-específicas, cada uma

capaz de reconhecer diversos epítomos, constituindo um sistema imediato de defesa.

O FcαRI tem algumas funções bem caracterizadas em infecções bacterianas. Tal receptor participa no sangue e nas mucosas da defesa imune mediada por IgA. A função da IgA sérica, ao contrário do que foi descrito para a SIgA, permanece pouco compreendida. IgG representa o componente mais importante de uma resposta imune secundária, enquanto IgA é raramente observada. Tanto um papel pró-inflamatório (174, 175), quanto anti-inflamatório (176, 177), já foram sugeridos. IgA sérica monomérica apresenta características anti-inflamatórias, sendo capaz de inibir funções como fagocitose induzida por IgG, “burst” oxidativo e produção de citocinas. Deficiência de IgA, além disso, é uma doença associada tanto a alergias e doenças auto-imunes, quanto a pneumonias de repetição (178). IgA polimérica e imunocomplexos de IgA, por outro lado, podem deflagrar resposta imune, via FcαRI. O FcαRI medeia fagocitose, ADCC e sua agregação em monócitos deflagra a liberação de diversas citocinas, entre elas, TNFα, IL-6, IL-1β e IL-8, além de componentes da via do ácido araquidônico e metabólitos do oxigênio (179-181). Bloqueio do FcαRI em neutrófilos humanos, inibe a fagocitose de *Bordetella pertussis* (175). Células de Kupffer exprimem o FcαRI e isso parece importante para o “clearance” de bactérias que passam a barreira mucosa, evitando-se, assim, o desenvolvimento de sepse (182). Estudos *in vivo* demonstraram que tais células ingerem *E. Coli* vigorosamente, quando opsonizadas com IgA humana (161).

3.4 Cadeia gama, ITAM e ITIM

Para avançarmos um pouco mais na estrutura dos FcRs, torna-se indispensável a descrição em maiores detalhes da cadeia gama dos FcRs, assim como dos motivos ITAM e ITIM. Duas classes de FcR são reconhecidas: 1) os receptores ativadores, caracterizados pela presença de uma sequência intra-citoplasmática ITAM associada ao receptor; 2) o receptor inibitório, caracterizado pela sequência intra-citoplasmática ITIM. Essas duas classes de receptores funcionam de maneira orquestrada e podem ser encontradas co-expressas na membrana de alguns tipos celulares (151). Como ambas as classes apresentam afinidade e especificidade comparáveis, agregação entre elas é comum, assim como entre componentes da mesma classe, modulando, assim, a magnitude das respostas efectoras. Fc ϵ RI, Fc γ RIIB e Fc γ RIIIA são co-expressos em mastócitos e células de Langerhans; Fc γ RI, Fc γ RIIB e Fc γ RIIIA em macrófagos murinos e Fc γ RI, Fc γ RIIB e Fc γ RIIIB em neutrófilos humanos. Importante ressaltar, agregação dos FcRs é o fator indispensável para se ativar este tipo de receptor. FcRs podem ser agregados por anticorpos ou antígenos multivalentes. Além disso, agregação de FcRs que não possuem nem ITAMs, nem ITIMs, não deflagra ativação celular. Alguns FcRs sem ITAMs utilizam FcRs com ITAMs para transdução de sinal. A co-agregação de FcR com ITAMs e outro com ITIMs regula negativamente a ativação celular (183). Da mesma forma, a co-agregação do Fc γ RIIB com o BCR tem potente efeito inibitório sobre a ativação de células B, já que tais receptores também possuem ITAMs na sua porção intracitoplasmática, podendo co-agregar o Fc γ RIIB e deflagrar sinal inibitório

semelhante. Em linfócitos T, entretanto, o único receptor Fc identificado é o FcγRIIB e, mesmo assim, tal receptor somente é expresso por células murinas, não sendo detectado em linfócitos T humanos.

O motivo imuno-ativatório baseado em tirosina (ITAM) é caracterizado por uma sequência YxxL repetida duas vezes e separadas por sete aminoácidos variáveis. FcRs com ITAMs são de dois tipos: 1) receptores com múltiplas proteínas, compostos de uma sub-unidade FcR, onde se conecta o ligante, associada a uma ou duas sub-unidades (cadeias gama), responsáveis por transdução do sinal e em cujas porções intra-citoplasmáticas se encontram os ITAMs; 2) receptores de IgG de cadeia única e exclusivos de humanos, o FcγRIIA e o FcγRIIC. Neste segundo tipo, o ITAM é único e as sequências YxxL são separadas por 12 aminoácidos, ao invés de 7.

Os FcRs associados à cadeia gama são quatro: FcγRI, FcγRIIA, FcεRI e FcαRI. Existe um ITAM no domínio intra-citoplasmático de cada cadeia gama, assim como um ITAM no domínio carboxi-terminal do FcRβ, subunidade exclusiva do receptor FcεRI. É a cadeia gama que permite a sinalização intra-celular desses receptores. A sub-unidade β, associada ao FcεRI, contém um ITAM, mas não é capaz de deflagrar sinalização intra-celular isoladamente. Kinet *et al.* demonstraram que tal cadeia funciona como um amplificador de sinal, pela mensuração da ativação de syk e mobilização de cálcio (184). Um resíduo no domínio transmembrana da sub-unidade FcRα interage com um resíduo aspartato na região transmembrana do FcRγ (cadeia gama). Essa interação permite a associação das duas sub-unidades. A cadeia gama se associa aos FcRs na forma de homodímeros (γγ). A cadeia gama é

necessária para a expressão do FcεRI, do FcγRI e do FcγRIIIA na superfície celular (**Figura 7**). Roedores também necessitam da cadeia β para a expressão do FcεRI (185). Camundongos deficientes em cadeia gama não expressam esses receptores (186), apesar de existirem relatos da expressão do FcγRI em células eucarióticas transfectadas, independentemente desta cadeia (183). A cadeia gama aumenta a afinidade tanto do FcγRI, quanto do FcγRIIIA ao ligante, supostamente por alteração da estrutura quaternária do receptor (187). A cadeia gama de ratos, camundongos e humanos é extremamente semelhante, 86% dos resíduos permanecendo idênticos entre as três espécies (188).

Figura 7 - Receptores Fc associados à cadeia gama e o receptor inibitório FcγRII

Um evento precoce, após a agregação dos FcRs com ITAMs, é a fosforilação dos receptores. Tal fosforilação desencadeia a ativação de diversas proteínas tirosino-quinases. O primeiro grupo a ser ativado é a família das src quinases, à qual pertence lyn, um dos componentes mais bem estudados desta família. Em seguida, em linhas gerais, ocorre a ativação de proteínas da família das syk quinases. Tais tirosina-quinases, por sua vez, fosforilam diversos substratos intra-celulares, entre eles, fosfolipídio-quinases, fosfolipases, moléculas adaptadoras e proteínas do citoesqueleto. A fosforilação de tirosinas induzida pelo FcR, por outro lado, é modulada por fosfatases membranárias e citoplasmáticas. Em última análise, os sinais gerados pelos FcRs ativam diversas vias, convergindo, por vezes, em vias ativadas também por outros receptores e que são: 1) vias que resultam no influxo celular de cálcio; 2) vias que levam à ativação da proteína-quinase C (PKC); 3) a via da ras, que atinge o núcleo celular e estimula a transcrição de diversos genes. Mais detalhadamente, uma vez ativada por syk, PLC γ gera metabólitos que ativam PKC e a via do inositol fosfato. Inositol trifosfato (IP3) deflagra a mobilização de cálcio intracelular, ligando-se a receptores de IP3 no retículo endoplasmático. Acredita-se que a elevação transitória do cálcio intra-celular abra os canais de cálcio da membrana plasmática, resultando num pico sustentado de cálcio intra-celular, o que é uma característica constante da ativação celular induzida por todos os FcRs com ITAMs (**Figura 8**). Conforme comentado, alguns sinais atingem o núcleo pela via da ras. Ras fosforila raf, que fosforila as MAP quinases. No núcleo, as MAP quinases ativam fatores de transcrição, levando à expressão de diversos genes. Fc γ RI e Fc γ RIIA induzem NF κ B em neutrófilos humanos. Fc γ RIIIA induz NFAT.

As respostas deflagradas pelos FcRs com ITAMs, entretanto, parecem depender mais do tipo celular do que do receptor. Diferentes FcRs com ITAMs ativam as mesmas respostas, quando expressos nas mesmas células. Ao contrário, quando expressos em células diferentes, o mesmo receptor efetua respostas diversas. Agregação de receptores Fc em macrófagos e neutrófilos ativa vias de sinalização que levam a alterações no citoesqueleto e fagocitose de partículas ligadas a IgG, assim como secreção de grânulos intra-citoplasmáticos. Sinalização mediada pelos FcRs também estimula a produção de espécies reativas do oxigênio e óxido nítrico, induz a secreção de citocinas e quimiocinas e promove a expressão de proteínas de superfície celular. Ademais, pela ingestão de patógenos, facilita a apresentação de determinantes patogênicos, estimulando resposta imune T-mediada. Em linhas gerais, portanto, a agregação de FcRs com ITAMs induz dois tipos de respostas: um resultante da ativação celular e outro de fenômenos de internalização do ligante. Todos os receptores associados à cadeia gama medeiam endocitose, assim como fagocitose. Fagocitose depende de fosforilação dos ITAMs e syk é fosforilada durante esse processo (189). Macrófagos de camundongos deficientes em cadeia gama mostraram-se incapazes de realizar fagocitose FcR-mediada de rosetas de hemácias de carneiro (186).

Figura 8 - Agregação e sinalização celular induzida pelo FcαRI, um exemplo de ativação ITAM-mediada. Adaptado de Monteiro et al. IgA Fc Receptors. *Ann Rev Immunol*, 2003

FcRs que não possuem ITAMs podem ser divididos em duas categorias. A primeira categoria constitui um receptor de IgG de cadeia única, denominado FcγRIIB, cuja porção intra-celular possui um motivo que inibe a ativação celular de outros receptores, após co-agregação. Este motivo contém uma única sequência YxxL, sendo designado ITIM, motivo imunoinibitório baseado em tirosina. A segunda categoria é composta por receptores que nem ativam, nem inibem a ativação celular, estando

envolvidos na transcitose e endocitose de imunoglobulinas. Eles são o receptor polimérico de imunoglobulinas e o FcR neonatal para IgG. Uma exceção é o FcγRIIIB, que não tem capacidade ativatória, mas contribui para a sinalização, associando-se a outros FcRs.

Dentre os receptores que não possuem ITAM, tem especial relevância o receptor FcγRIIIB. Como já foi comentado, tal receptor tem um papel inibitório na ativação de todos os receptores Fc com ITAMs, assim como na ativação do BCR. FcγRIIIB participa, na verdade, de três respostas efetoras inibitórias. No primeiro caso, co-agregação desse receptor a um receptor que contenha ITAM leva à fosforilação do ITIM, por uma quinase da família lyn, originando um domínio de reconhecimento SH2 que é o local de ligação de SHIP (inositol polifosfatase 5-fosfatase), a qual hidrolisa PIP₃, produto da ativação do ITAM, liberando a ancoragem de proteínas como Btk e PLCγ da membrana, ocasionando inibição da mobilização de cálcio deflagrada pelo ITAM. Fosforilação do ITIM leva também à inibição da proliferação celular, pela inativação de MAP quinases (MAPK) e do recrutamento da proteína-quinase anti-apoptótica Akt. Por fim, homo-agregação deste receptor induz um sinal pró-apoptótico que independe da fosforilação do ITIM. Este sinal pró-apoptótico é bloqueado pelo recrutamento de SHIP, após co-agregação do FcγRIIIB ao BCR, devido à necessidade de Btk para a eficácia do mesmo (190-192). FcγRIIIB, neste caso, parece agir como um receptor determinante na seleção negativa de células B, cujos BCRs tenham afinidade reduzida pelo antígeno, como resultado de hipermutação somática. Esta resposta apoptótica é reconhecida como um sinal de stress celular e necessita de co-

agregação de múltiplos FcγRIIB, não sendo induzida por simples dimerização deste receptor (193) (**Figura 9**). FcγRIIB, além disso, realiza endocitose, porém não é capaz de induzir fagocitose (194).

Figura 9 - Co-agregação do FcγRIIB ao BCR e inibição ITIM-dependente da ativação e proliferação celular (à esquerda). À direita, homo-agregação do FcγRIIB, induzindo apoptose de células B, independente de fosforilação do ITIM. Adaptado de Ravetch et al. *Ann Rev Immunol*, 2001

3.5 Receptores relacionados aos receptores Fc

Existem evidências crescentes mostrando que as células mielóides expressam diversas famílias de receptores, contendo isoformas ativatórias e inibitórias. Recentemente, foi caracterizado em humanos uma nova família de receptores expressos nesse tipo celular, chamados de ILT's ("immunoglobulin-like transcripts"), LIR's ("leukocyte Ig-like receptors") ou MIR's ("monocyte/macrophage Ig-like receptors"). Os receptores dessa família

apresentam isoformas com diferentes domínios intra-citoplasmáticos e transmembrana, alguns mediando ativação e outros, inibição celular (195). ILT/LIR/MIR's incluem, pelo menos, 10 receptores distintos. Alguns deles (ILT-2, ILT-3, ILT-4, ILT-5 e LIR-8) contêm longas caudas citoplasmáticas com ITIMs. Estes receptores inibem ativação celular pelo recrutamento da fosfatase SHP-1. Outros receptores (ILT-1, "ILT-1-like protein", ILT-7, ILT-8 e LIR-6a) contêm uma curta porção intra-citoplasmática, por meio da qual se associam à cadeia gama dos receptores Fc (FcR γ). ILT/LIR/MIR são expressos preferencialmente em células mielóides, mas células B expressam ILT-2 e sub-grupos de células NK e T expressam ILT-1, ILT-2 ou ILT-5.

KIRs ("killer-cell Ig-like receptors") são receptores de células "natural-killer" que ligam moléculas do MHC. A homologia entre ILTs e KIRs sugeriu originariamente que os ILTs seriam receptores de moléculas do MHC I. Entretanto, somente ILT-2 e ILT-4 parecem interagir com tais moléculas. ILT-2 co-agrega ao TCR, o que reduz a fosforilação do CD3 ξ . Os demais receptores ILT/LIR/MIRs continuam com seus ligantes desconhecidos.

Os receptores murinos que correspondem aos ILT/MIR/LIR's são chamados de PIRs ("paired Ig-like receptors"). Tais receptores contêm 6 domínios extra-celulares "Ig-like" e são encontrados em células mielóides, dendríticas e linfócitos B. PIR-B é expresso, ademais, em plaquetas e megacariócitos murinos. Os receptores PIR foram identificados, devido às pesquisas para se encontrar um homólogo murino do receptor humano Fc α R (196). Enquanto PIR-B é um receptor inibitório com 4 ITIMs na sua porção intra-citoplasmática, PIR-A é um receptor ativatório, associado à cadeia gama

dos receptores Fc (197). Na ausência desta associação, PIR-A não é expresso na superfície celular (198, 199). O ligante dos receptores PIR permanece desconhecido. Incubação de células transfectadas com receptores PIR e hemácias revestidas com IgG1, IgM, IgE ou IgA não mostrou ligação às hemácias, enquanto células transfectadas com receptores Fc se ligaram às mesmas, sugerindo que os receptores PIR não reconhecem imunoglobulinas (200).

SIRPs são uma família de glicoproteínas transmembrana, expressas em neurônios e células mielóides. Alguns deles, chamados SIRP α 1 e α 2, apresentam ITIMs intra-citoplasmáticos, recrutam as fosfatases SHP-1 e SHP-2 e inibem vias de sinalização celular. O ligante do SIRP α é o CD47, uma proteína com diversas funções imunológicas e neuronais (**Figura 10**).

Figura 10 - Cascata de sinalização celular induzida por receptores Fc e SIRP α

OSCAR é um outro receptor recém-descrito, que se associa à cadeia gama dos receptores Fc (201, 202) e envolvido em endocitose e apresentação antigênica. Ao contrário do receptor humano (hOSCAR), o receptor murino (mOSCAR) é expresso somente em osteoclastos. hOSCAR está envolvido com a maturação de células dendríticas. Quando a estimulação deste receptor é associada à ativação de determinados receptores *Toll-like*, a capacidade de células dendríticas de ativar linfócitos T “naive” é bastante amplificada (203).

A glicoproteína VI, um receptor de colágeno presente em plaquetas, também se associa à cadeia gama dos receptores Fc (204). Ademais, a

interação entre o fator de von Willebrand e a glicoproteína Ib estimula vias de sinalização que requerem fosforilação do FcR γ para ativação máxima (205).

Por fim, cabe citar uma nova família de receptores, recém-identificados tanto em humanos, quanto em camundongos, e nomeados homólogos dos receptores Fc (FcRH). Até o presente momento, foram identificados 6 homólogos dos receptores Fc (huFcRH1-6). Além disso, análise recente do genoma humano identificou um novo gene relacionado aos receptores Fc, os receptores FcRX/FcRL/FREB e FcRY. Caracterização dos FcRH murinos indica diversidade considerável, quando comparados a humanos. Os ligantes dos FcRH permanecem desconhecidos. Os FcRH possuem ITIMs, ITAMs ou ambos os tipos de motivos sinalizatórios em suas porções intracitoplasmáticas. Não é descrita associação entre a cadeia gama e os FcRH (206) (**Figura 11**).

Figura 11 - Receptores Fc conhecidos até o presente momento. Adaptado da tese de Benoit Pasquier, Université Paris V, 2004

3.6 Receptores Fc e doenças inflamatórias

Devido ao desenvolvimento de camundongos deficientes em componentes específicos do complemento, assim como em diferentes receptores Fc, conseguiu-se estabelecer que o papel desses dois sistemas não é interdependente, nem tampouco redundante. A ativação do complemento não está envolvida em inflamação mediada por imunocomplexos, mas é essencial na proteção mediada por anticorpos naturais. Enquanto isso, os receptores Fc ligam IgG citotóxica e imunocomplexos às células efectoras, apresentando um papel dominante nas doenças auto-imunes deflagradas por auto-anticorpos (207).

Camundongos deficientes em cadeia gama não apresentam anafilaxia passiva (cutânea ou sistêmica) deflagrada por IgE, devido à incapacidade de expressão do FcεRI, enquanto anafilaxia ativa depende, principalmente, do FcγRIIIA.

IgG de coelho produzidas contra glóbulos vermelhos de camundongo, medeiam uma anemia aguda, quando injetadas em camundongos selvagens. Injeção desses mesmos anticorpos em camundongos deficientes em cadeia gama demonstrou que esses animais estão protegidos. A mesma injeção em animais deficientes em C3 ou C4, entretanto, não demonstrou diferença alguma em comparação aos animais selvagens. Análise do fígado dos animais demonstrou que as hemácias revestidas de IgG são fagocitadas pelas células de Kupffer, fenômeno ausente nos gama-“knockout”. Situação semelhante foi demonstrada com um anticorpo monoclonal dirigido contra plaquetas murinas (159, 207).

O modelo cutâneo para doença por imunocomplexos, a reação de Arthus, resulta do depósito de imunocomplexos na pele, após injeção de antígeno. Edema, hemorragia e infiltração neutrofílica são alterações características desta reação. Camundongos deficientes em C3 ou C4 apresentam reação normal, enquanto camundongos deficientes em cadeia gama ou FcγRIII não desenvolvem reação de Arthus. Assim, em um modelo de glomerulonefrite induzida pela injeção de anticorpos anti-membrana basal, observou-se que proteinúria e alterações glomerulares são atenuadas em camundongos deficientes em cadeia gama. Depleção do complemento, por outro lado, não altera a evolução desta doença. Estudos realizados com o

modelo NZB/NZW, um bem caracterizado modelo de lúpus, também demonstraram proteção dos camundongos deficientes em cadeia gama (208). Tais estudos, desta forma, suportam um papel dominante do FcγRIII nas reações de hipersensibilidade do tipo II e III.

Contra-balanceando as propriedades ativatórias dos FcR, portanto, temos o receptor inibitório FcγRIIB. Camundongos deficientes em FcγRII apresentam níveis elevados de anticorpos em resposta a um insulto antigênico, além de uma anafilaxia mediada por IgG, fato que demonstra o papel inibitório importante desse receptor na síntese de anticorpos e na regulação da resposta a imunocomplexos (153, 209, 210). FcγRIIB funciona, assim, na manutenção da tolerância periférica, regulando a amplitude das respostas ativatórias e determinando o seu fim. Camundongos FcγRII-“knockout” de fundo genético C57/Bl6 desenvolvem anticorpos anti-DNA e anti-cromatina e sucumbem a uma glomerulonefrite fatal, após 8 meses de vida. Tal fenótipo depende também de outros fatores genéticos, não sendo visto em fundo C129 ou Balb/c. Camundongos deficientes em cadeia gama, cabe ressaltar, apresentam níveis normais de FcγRII (211).

Por fim, caminhando na contra-corrente daquilo que parecia um consenso e desmistificando o conceito de um papel exclusivamente ativatório para a cadeia gama (FcRγ), Pasquier et al. (212) demonstraram que tratamento com um anticorpo monoclonal anti-FcαR (A77) é capaz de induzir um sinal inibitório, ITAM-dependente, que é capaz de suprimir asma (induzida pela inalação de metacolina) em camundongos transgênicos para tal receptor (FcαRI ou CD89). Tal artigo abre as portas, assim, para a compreensão dos

efeitos antagônicos da IgA sérica humana. A agregação desse receptor por ligantes multiméricos estimula ativação celular pelo recrutamento de syk. A presença de IgA sérica ou A77, na ausência de ligantes multiméricos, por outro lado, induz recrutamento da fosfatase SHP-1 pelo Fc α RI, impedindo a fosforilação de syk, LAT e ERK, após agregação do Fc ϵ RI. Os motivos ativatórios baseados em tirosina (ITAMs), portanto, podem desencadear sinalização ativatória ou inibitória. Esse novo conceito vai completamente contra o conhecimento clássico de que ITAMs e ITIMs regulam respostas opostas e coloca em discussão certas bases do conhecimento atual em Imunologia.

O papel dos receptores Fc e da cadeia gama foi, durante décadas, pouco valorizado em sepse. Resultados do nosso laboratório começaram a mudar essa visão, ao demonstrar um inesperado aumento de sobrevivência, quando camundongos deficientes em cadeia gama foram comparados a camundongos selvagens, após ligadura e punção cecal. Hemoculturas e culturas de lavados peritoneais revelaram uma forte predominância de *E. coli* nas culturas dos animais selvagens em sepse, assim como um número bem maior de bactérias do que o encontrado nos animais deficientes em cadeia gama. **Estudos de microscopia confocal confirmaram a suspeita de que a fagocitose de *E. coli* está significativamente aumentada em células deficientes em cadeia gama (213).** Este efeito bipolar da cadeia gama, ou seja, sua característica de regular tanto respostas ativatórias, quanto inibitórias, é um campo de atenção crescente em pesquisa. Estudos do nosso grupo revelaram que *E. coli* se liga diretamente a receptores Fc γ RIII (CD16)

de camundongos e que esta interação entre *E. coli* e Fc γ RIII induz um sinal inibitório (chamado de ITAMi) com recrutamento estável de SHP-1, que leva à inibição de vias de fagocitose e aumento da secreção de TNF α (214). Desvendamos, desta forma, um inusitado mecanismo utilizado por bactérias *E. Coli* para evadir do sistema imune (**ANEXO A**).

4 Mecanismos bacterianos de evasão

4.1 Conceitos gerais

Para crescer e proliferar, as bactérias necessitam reconhecer e interagir com o meio ambiente. É preciso, desta forma, que elas sejam capazes de responder apropriadamente às alterações ambientais, obter nutrientes e, no caso de bactérias que habitam animais ou plantas, interagir com tecidos e células do hospedeiro. Uma importante maneira, pela qual bactérias obtêm nutrientes do meio em que se encontram, por meio da secreção de enzimas (proteases, nucleases, polissacaridases, lipases), graças às quais são gerados produtos de clivagem que são internalizados por difusão ou transporte ativo. Interação com células do hospedeiro depende com frequência de proteínas secretadas por bactérias. Desta forma, diversas vias foram desenvolvidas por tais microrganismos, no intuito de exportar proteínas rumo ao seu destino final e responder a tais necessidades.

A via secretória geral (“general secretory pathway - GSP”) é o principal sistema, pelo qual diversas proteínas são transportadas para dentro ou pela membrana citoplasmática da bactéria. Este sistema é suficiente para organismos gram-positivos, que são desprovidos de membrana externa. Entretanto, proteínas que precisam ir além do periplasma de germes gram-negativos, dependem dos ramos terminais do GSP. O GSP de *E. coli*, por exemplo, compreende uma translocase associada à membrana (Sec) e uma ou mais chaperonas moleculares, que levam as proteínas a estes ramos terminais do GSP.

Antes da descrição dos ramos terminais do GSP, entretanto, cabe citar

um segundo sistema secretório geral, recentemente descrito. Esta via tem sido chamado de sistema TAT (*"twin-arginine translocation system"*), já que as proteínas do seu substrato apresentam motivos com aminoácidos característicos, que incluem, invariavelmente, resíduos arginina consecutivos na sua sequência sinal. Além de *E. coli*, diversos organismos gram-negativos e gram-positivos possuem sistema do tipo TAT.

A grande maioria das proteínas secretadas por bactérias gram-negativas, incluindo diversas exoenzimas ou exotoxinas envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças, consegue atravessar a membrana externa pelo principal ramo terminal do GSP, também conhecido como sistema de secreção do tipo II. Este sistema de secreção foi, originariamente, descrito em *Klebsiella oxytoca* e, subsequentemente, em diversas outras bactérias gram-negativas. Neste sistema de secreção, as proteínas são transportadas ao periplasma pelo GSP, onde adquirem conformação final, sendo então secretadas para o meio externo. Outra via importante do ramo terminal do GSP é o sistema chaperona-indicador (*"chaperone-usher pathway"*), que é necessário para a síntese de determinados pili e fímbrias. Os demais ramos terminais do GSP são os sistemas de secreção do tipo IV e V.

Assim como o sistema do tipo II, diversas proteínas do sistema de secreção do tipo IV estão associadas à membrana. O sistema de secreção do tipo IV, entretanto, é capaz de secretar proteínas diretamente no citoplasma da célula-alvo. Diversas proteínas possuem também, sistemas do tipo I, dedicados ao transporte de proteínas específicas ou determinados substratos

não-proteicos. O sistema de secreção do tipo I faz parte de uma grande família, conhecida como transportadores ABC (“*ATP-binding cassette*”), presentes ainda em células eucarióticas. Sistemas de secreção do tipo I são responsáveis, por exemplo, pela secreção de diversos peptídeos bacterianos.

Sistemas de secreção do tipo III medeiam a injeção de fatores de virulência dentro da célula eucariótica, interferindo, assim, com a organização do citoesqueleto, a liberação de citocinas e a sinalização da célula invadida, podendo, até mesmo induzir apoptose. Este sistema de secreção é importante, tanto para a adesão, quanto para a invasão e citotoxicidade do agente invasor. Este sistema já está bem caracterizado em diversos microrganismos, dentre eles, *Yersinia enterocolítica*, *E. coli* enteropatogênica, *Pseudomonas aeruginosa* e *Chlamydia pneumoniae*. Assim como o sistema do tipo I, o sistema do tipo III é Sec-independente. Até recentemente, o sistema de secreção havia sido caracterizado, exclusivamente, em bactérias gram-negativas. Pesquisando-se *Streptococcus pyogenes*, entretanto, foi demonstrado que bactérias gram-positivas também possuem a capacidade de injetar proteínas efetoras diretamente no citoplasma da células-alvo.

Bactérias sobrevivem no hospedeiro, devido à capacidade de induzirem a ativação de determinados genes, ou seja, aqueles necessários à adaptação ao novo meio e fuga dos mecanismos de defesa imune. Isto requer que a bactéria seja capaz de perceber a situação em que se encontra, regulando assim a transcrição de diversos dos seus próprios genes, ativando-os ou desativando-os.

Sistemas de transcrição de sinal de dois componentes (TCSTS) são, provavelmente, a maneira mais importante pela qual as bactérias reconhecem e respondem ao meio. TCSTS estão envolvidos na regulação de diversas funções celulares, tais como esporulação, quimiotaxia, quorum sensing, ativação de fatores de virulência, etc. Um TCSTS, basicamente, detecta um sinal externo e direciona o organismo a responder a esse sinal. Esta resposta é decorrente da indução ou repressão de genes apropriados.

Ao contrário das células eucarióticas, bactérias não possuem membrana nuclear. Consequentemente, transcrição e tradução ocorrem no mesmo compartimento, simultaneamente. A organização de diversos genes em unidades operacionais (operons) acelera ainda mais este tipo de resposta. Repressão deste tipo de resposta, por outro lado, é obtida pela ação de proteínas repressoras, que impedem a ação da RNA polimerase. Além disso, a atividade das proteínas repressoras pode, igualmente, ser ativada (co-repressores) ou bloqueada (proteínas indutoras) por moléculas acessórias, que têm a capacidade de se ligarem a elas.

A superfície das bactérias apresenta componentes como pili, proteínas da membrana externa (OMPs), flagelos, LPS e componentes da cápsula, que são importantes em fenômenos de interação bactéria-célula, tais como adesão e evasão de fagocitose. As bactérias são capazes de alterar a expressão destas moléculas (variação de fase), ou sua natureza antigênica (variação antigênica), no intuito de não serem reconhecidas pelo sistema imune do agente invadido, podendo, assim, disseminar mais facilmente. Isso é possível, graças a diversos mecanismos, tais como inversão de DNA,

recombinação homóloga de DNA, modificações pós-traducionais ou mutações pontuais. Ainda, diferentes tipos de elementos genéticos móveis são encontrados em bactérias. Estes incluem, plasmídeos, elementos transponíveis e bacteriófagos.

A grande maioria dos plasmídeos são moléculas de DNA circular em dupla-hélice, capazes de replicação independente. Alguns, entretanto, são lineares. O tamanho varia de 1kb a 100kb e o número por célula, de 1 a 40. Em *E. coli*, por exemplo, mais de 300 diferentes plasmídeos já foram detectados. Diversos plasmídeos carregam genes de resistência a antibióticos ou fatores de virulência, apresentando papel de relevância na patogenicidade de diversas bactérias.

Bacteriófagos são vírus que infectam bactérias. Diversos deles podem ser considerados elementos genéticos móveis, com capacidade de se integrar ao cromossomo da bactéria. Alguns bacteriófagos carregam genes que codificam a produção de toxinas, podendo transformar bactérias não-toxigênicas, em toxigênicas.

Elementos transponíveis são sequências de DNA que podem se mover de um local para outro do genoma bacteriano, podendo carregar consigo sequências que codificam, por exemplo, resistência a antibióticos ou produção de toxinas.

Ilhas de patogenicidade (PAIs) são elementos extensos, integrados aos cromossomos de agentes patogênicos, que carregam um ou mais determinantes de virulência. São encontrados tanto em germes gram-negativos, quanto gram-positivos (215).

Durante as últimas décadas, tornou-se evidente que o modo natural de crescimento de bactérias, em muitos casos, não é como células isoladas, suspensas em meio aquoso, mas como comunidades de células vivendo juntas, em estruturas organizadas, e conhecidas como biofilmes (216). Um biofilme, caracteristicamente, é uma estrutura tridimensional, contendo uma ou mais espécies de bactérias; forma-se em interfaces (sólido-líquida, líquida-ar, sólido-ar); apresenta heterogeneidade espacial; é, geralmente, permeabilizado por canais de água e, ademais, é um meio dentro do qual os organismos conseguem viver com diminuição marcante da susceptibilidade a antibióticos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Exemplos de doenças por biofilmes, incluem cáries, periodontites, osteomielite, endocardites, infecção de próteses, cateteres, assim como infecções pulmonares em portadores de fibrose cística. Exemplos de microrganismos que, frequentemente, formam biofilmes, incluem *Ps. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* e *Streptococcus spp.*

Aspectos fundamentais de virulência bacteriana, incluem adesão, invasão e produção de exotoxinas. Virulência pode ser definida como o conjunto de respostas gênicas, necessárias para a sobrevivência e persistência da bactéria no interior do hospedeiro.

Transferência horizontal de genes é um evento maior na geração de diversidade. Fagos, ilhas de patogenicidade, plasmídeos e elementos transponíveis contêm fatores de virulência que alteram o comportamento do organismo no qual estão inseridos. Mutações aleatórias e duplicação de genes também contribuem significativamente. O fato de determinadas

bactérias se tornarem patogênicas ao mudarem de ambiente, se deve provavelmente ao fato de responderem ao novo meio, ativando fatores de virulência assim adquiridos. As bactérias desenvolveram sistemas sofisticados que funcionam de uma maneira similar, baseada em dois componentes, possibilitando esses tipos de resposta. Tal sistema de transdução de sinal de dois componentes (TCSTS) é composto por um componente que funciona como sensor, localizado na membrana citoplasmática, monitorando parâmetros ambientais, e por um componente intra-citoplasmático, que inicia algum tipo de resposta. Apesar desta resposta, geralmente, envolver alterações de expressão gênica, este não é sempre o caso. Em organismos móveis, por exemplo, a resposta pode ser, simplesmente, alterações na movimentação de flagelos, alterando a direção em que o organismo se move.

Complementando vias de sinalização que monitorizam alterações no ambiente externo, existem sensores, conhecidos como domínios PAS, localizados no citoplasma. Tais sensores monitorizam alterações no potencial redox, na concentração de oxigênio, na intensidade luminosa e na concentração de alguns pequenos ligantes.

4.2 Sinalização entre bactérias

Até recentemente, as bactérias eram consideradas como seres solitários, incapazes de estabelecer comunicação entre si. Atualmente, entretanto, sabe-se que as bactérias tendem a formar comunidades, nas quais os membros se comunicam por meio de um processo conhecido como “quorum sensing”.

“Quorum sensing” é a habilidade das bactérias de iniciar transcrição de certos genes, somente quando uma determinada concentração de bactérias é atingida num meio (217). As bases moleculares do “quorum sensing” têm sido investigadas extensamente e sabe-se que envolvem um auto-indutor. Tal auto-indutor, quando as bactérias se encontram em pequena concentração, difunde-se para fora da bactéria, sendo incapaz de induzir qualquer tipo de sinal. Quando a concentração de bactérias aumenta, entretanto, o auto-indutor começa a entrar nas bactérias vizinhas, assim como volta a se difundir para dentro da bactéria que o produziu, ligando-se em receptores intracitoplasmáticos que são, desta forma, ativados e capazes de induzir a transcrição de determinados genes. Mecanismos de “quorum sensing” já foram descritos em diversas bactérias gram-negativas, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas salmonicida*, *Burkholderia cepacia* e *Yersinia enterocolitica*.

“Quorum sensing” foi, igualmente, observado em bactérias gram-positivas. Tais bactérias, entretanto, utilizam mais comumente, oligopeptídeos como moléculas sinalizadoras. Tais oligopeptídeos são secretados com o auxílio de proteínas transportadoras, constituídas por cassetes ligados a ATP (“ABC transporter”). Neste caso, o peptídeo sinalizador costuma ser produzido em forma inativa e, após ativação e secreção, é capaz de se ligar a receptores TCSTS específicos. Este tipo de sinalização foi descrita em diversas bactérias gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*.

Diversas são as vantagens dos mecanismos de “quorum sensing”.

Graças a tal habilidade, são controlados processos que só fazem sentido quando é atingida uma determinada população mínima de bactérias, tais como transferência de DNA. Além disso, a capacidade de uma bactéria de limitar sua virulência até atingir uma determinada concentração, deve servir como mecanismo protetor contra a resposta imune do hospedeiro que, desta forma, não é alertada de maneira indiscriminada.

4.3 Adesão bacteriana

O processo de adesão de uma bactéria a uma célula é possível, devido a interações moleculares específicas, sendo acompanhado de alterações no fenótipo da bactéria e, quando a adesão ocorre em células do hospedeiro, no comportamento destas.

Certos aspectos limitam a adesão de bactérias às superfícies externas do hospedeiro. O fato de que tais superfícies descamam, é um dos aspectos mais importantes. Em alguns casos, adesão é seguida de invasão do tecido. A bactéria pode, então, crescer dentro do tecido ou disseminar para outros locais.

Acredita-se que a adesão de bactérias a células do hospedeiro é mediada, principalmente, por interações hidrofóbicas, pontes de cátions e associações do tipo receptor-ligante. As moléculas da superfície bacteriana responsáveis por essa adesão, são conhecidas como adesinas. Diversos estudos têm sido dirigidos para a elucidação das interações receptor-ligante, entre bactérias e superfícies de adesão. O número de adesinas identificadas, até o momento, é extenso. Muitas destas estruturas, entretanto, são

multifuncionais e estão envolvidas em processos diversos, não relacionados a mecanismos de adesão. Exemplos de moléculas que parecem designadas, exclusivamente, ao propósito de mediar adesão a uma superfície inclui as fímbrias e os pili. Outros exemplos são os flagelos, componentes da parede celular, curli e estruturas da cápsula.

Um microrganismo, geralmente, possui diversas adesinas, apesar de ser improvável que todas elas sejam expressas ao mesmo tempo. O mais lógico é tais adesinas serem expressas em momentos apropriados. Bactérias podem aderir à matriz extracelular, assim como a receptores de células do hospedeiro para estas moléculas da matriz. Para bactérias que adotam um estilo de vida extracelular, adesão a moléculas da matriz é uma característica importante para sua existência. Exemplos de moléculas da matriz extracelular em que uma bactéria pode aderir incluem colágeno, elastina, laminina, fibrinogênio, fibronectina e heparan sulfato.

Há muito tempo se reconhece que uma determinada bactéria tende a aderir, colonizar e, possivelmente, induzir doença, em um tipo específico de tecido. Este fenômeno é chamado de tropismo tissular. Desta forma, a causa mais comum de amigdalite é infecção por *S. pyogenes*, enquanto *Neisseria gonorrhoeae* apresenta tropismo pelo epitélio uretral e *Salmonella typhimurium* pelo epitélio intestinal.

Adesão bactéria-célula altera ambos os componentes desta interação. A bactéria precisa se adaptar ao novo ambiente, propiciado pela célula à qual aderiu, preparando-se, muitas vezes, para a invasão. A célula, por sua vez, também reage ao contato com a bactéria.

No que se refere a células epiteliais, a maior parte das interações bactéria-célula envolve membros da flora normal. Adesão destes organismos não parece induzir alterações dramáticas no comportamento de ambos os membros desta associação, apesar de permanecerem obscuros os motivos desta aparente indiferença. Neste sentido, bactérias patogênicas foram melhor estudadas. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), por exemplo, apresenta características de adesão particulares e bem descritas, que envolvem translocação de proteínas e formação de pedestais. Por um sistema de secreção do tipo III, uma proteína nomeada Tir é injetada no interior da célula epitelial, sofrendo fosforilação e inserção na membrana citoplasmática e, funcionando, assim, como receptor para uma adesina bacteriana, chamada intimina. Interação Tir-intimina ativa via de sinalização que resulta em rearranjo no citoesqueleto da célula-hospedeira e perda de microvilos com formação, subsequente, de pedestal (protusão característica de parte da membrana da célula epitelial, sobre a qual a bactéria passa a residir). Além destas alterações morfológicas, alterações funcionais também podem ser induzidas na célula hospedeira, tais como a secreção de diversas citocinas.

Além de aderir a células epiteliais, as bactérias podem aderir a outros tipos celulares. Estes incluem fibroblastos, células endoteliais e células fagocíticas. A fim de colonizar tecidos internos, as bactérias necessitam atravessar o endotélio vascular. Diversas bactérias desenvolveram esta capacidade como, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *E. coli* e *Ps. aeruginosa*. Todas elas são capazes de provocar sepse por disseminação hematogênica.

4.4 Invasão

Os organismos que conseguem se disseminar por via hematogênica, desenvolveram uma gama de fatores de virulência que os protege dos sistemas de defesa do hospedeiro. O interesse de uma bactéria em invadir a corrente sanguínea, provavelmente, é de se estabelecer num ambiente ideal para crescimento e proliferação, sem necessidade de competição com outras bactérias. Para atingir tais locais, a corrente sanguínea é a rota de acesso. Outro modo de atingir sítios distantes, é por meio da lise de tecidos, por degradação enzimática de componentes da matriz extracelular.

Para invadir uma célula não-fagocítica, as bactérias podem induzir a própria internalização. No que se refere à sobrevivência em células fagocíticas, entretanto, não parece apropriado falarmos em invasão. O que provavelmente ocorre é que os organismos são fagocitados, tendo desenvolvido, entretanto, meios de sobreviver no interior dos fagócitos.

Exemplos de bactérias que induzem alterações no citoesqueleto da célula-hospedeira, induzindo a própria internalização, incluem *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Algumas bactérias, entretanto, são capazes de atravessar junções intercelulares, passando entre as células, e não através delas. Tal processo é conhecido como paracitose.

Invasão bacteriana pode levar uma célula a secretar citocinas e/ou derivados do ácido araquidônico, aumentar a expressão de moléculas de adesão, sintetizar fator tissular ou entrar em apoptose. Efeitos na bactéria, por outro lado, incluem ativação de genes necessários para sobrevivência no

novo meio, assim como desativação de genes que deixaram de ser necessários.

4.5 Exotoxinas

Exotoxinas podem ser secretadas pelas bactérias ou liberadas durante sua lise. Toxinas se ligam a receptores específicos na superfície da célula-alvo (218).

Toxinas do tipo I agem do lado de fora da célula-alvo, interferindo na transdução de sinais da célula hospedeira, pela ativação inapropriada de seus receptores. Exemplos incluem toxinas estáveis ao calor, presentes em cepas de *E. coli* enterotoxigênica, assim como os superantígenos.

Toxinas do tipo II se inserem no interior da membrana celular da célula-alvo, formando canais que permitem o fluxo de pequenas moléculas e íons, com prejuízo do potencial elétrico. Exemplos incluem a α -toxina de *S. aureus* e a streptolisina-O de *S. pyogenes*. Outras toxinas formadoras de canais podem gerar um poro na membrana, para a translocação de enzimas tóxicas. A toxina diftérica age desta maneira. Outras toxinas, ainda, danificam a membrana, por degradação enzimática. Tal é o caso das fosfolipases, produzidas por diversas bactérias, dentre elas, *Cl. perfringens*, *L. monocytogenes*, *Ps. aeruginosa* e *S. aureus*, assim como das proteases, produzidas por bactérias como *Clostridium tetani*, *Cl. botulinum* e *B. anthracis*.

Toxinas do tipo III são ativas dentro da célula-alvo. São conhecidas como toxinas AB e são encontradas em várias bactérias. O componente A é responsável pela atividade enzimática, enquanto o componente B realiza adesão e translocação da enzima. Diversas variações são descritas, desde

um único polipeptídeo com atividade A e B até, por exemplo, combinações AB₅. As atividades enzimáticas descritas variam, incluindo proteólise, ribosilação de ADP, atividade adenil-ciclase, fosfatase, glicosiltransferase e deamidase. Por meio destas estratégias, as bactérias conseguem interferir com o funcionamento celular das mais diversas maneiras. Pelo sistema de secreção do tipo III, as toxinas são transportadas do citoplasma bacteriano para o citoplasma da célula-alvo, por um aparato que requer contato direto bactéria-célula (219). Bactérias capazes de realizar este tipo de secreção de toxinas, incluem os gêneros *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella* e *Escherichia*.

Toxinas do tipo IV são, assim como as do tipo III, injetadas no interior do citoplasma das células-alvo. A compreensão deste sistema de secreção é, ainda, precária. *Legionella pneumophila* e *Helicobacter pylori* são exemplos de bactérias que utilizam este sistema para exportar proteínas ou DNA.

4.6 Subversão e sabotagem do sistema imune

O sistema imune desenvolveu sistemas complexos de detecção e ataque a bactérias patogênicas que, por sua vez, descobriram estratégias mirabolantes para escapar a essa miríade de sinais (220-223).

Mecanismos de pressão seletiva levaram as bactérias a desenvolver mecanismos para evadir, inibir e manipular a resposta imune do agente invadido (224, 225).

Diversas famílias de receptores eucarióticos utilizam complexos evolutivamente conservados, tais como o receptor Toll/IL-1 (TIR) e o domínio pirina (PYD) para reconhecer micróbios e induzir a produção de citocinas pró-

inflamatórias. Diversas bactérias, em contrapartida, expressam domínios semelhantes a estes complexos ou proteínas capazes de sabotar essas vias de sinalização (226, 227).

As bactérias, ademais, conseguem alterar a síntese de citocinas do hospedeiro, degradar citocinas pró-inflamatórias, utilizar receptores solúveis como veículos para invasão celular, dentre inúmeras outras formas de escapar do ataque hospedeiro. Nos próximos parágrafos, diversos destes mecanismos serão descritos (56).

IgA secretória é a principal imunoglobulina em superfícies mucosas. Seu papel conhecido, até o momento, é o de se ligar a patógenos encontrados no meio externo, evitando que adiram à mucosa. Existem boas evidências, entretanto, de que as bactérias desenvolveram modos de evadir à IgA secretória. Três mecanismos foram desenvolvidos para tal fim.

A IgA secretória é fortemente glicosilada e tal glicosilação participa na conformação da proteína, sua carga, caráter hidrófilo e susceptibilidade a proteases. As bactérias produzem diversas proteases, que removem as cadeias laterais de carboidratos da IgA. Outras bactérias produzem sialidases, que removem ácido siálico, dos oligossacárideos associados à IgA.

Proteólise é o segundo mecanismo bacteriano de evasão da IgA. Por clivagem proteolítica da região da forquilha de IgA1, as IgA1 proteases interferem na função de barreira de tais anticorpos. IgA2, por possuir uma região de forquilha mais curta, em geral, não é susceptível às IgA1 proteases.

As IgA1 proteases também apresentam grande diversidade antigênica, o que dificulta ao hospedeiro, produzir anticorpos contra elas.

Além das IgA1 proteases, algumas bactérias, tais como *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Helicobacter pylori* e *Streptococcus pneumoniae*, produzem proteínas que se ligam à IgA, impedindo que a porção Fc do anticorpo se ligue ao respectivo receptor.

Nas superfícies mucosas, além de evadir da ação da IgA secretória, as bactérias desenvolveram meios de evadir da ação de peptídeos antimicrobianos. Tais substâncias são produzidas, como componentes da resposta inata. Para evadir do ataque destas substâncias, *Salmonella typhimurium*, por exemplo, é capaz de inserir grupos palmitato na sua membrana externa, inibindo, assim, a habilidade de peptídeos antibacterianos de se inserirem dentro da membrana.

As citocinas também apresentam um papel de destaque em infecções bacterianas, orquestrando a resposta de diversos tipos celulares. Bactérias, por sua vez, produzem uma numerosa quantidade de moléculas capazes de induzir células eucarióticas a produzirem citocinas. Tais moléculas são conhecidas como modulinas. As modulinas podem ser componentes não-proteicos da parede celular (LPS, peptidoglicano, ácido lipoteicoico, etc) ou componentes proteicos. Existem, além disso, toxinas bacterianas capazes de inibir a síntese de determinadas citocinas (228). Os inflamassomos, inclusive, não são uma exceção. Diversos mecanismos de sabotagem são utilizados pelas bactérias para evadir deste mecanismo de defesa (229).

O fato de bactérias induzirem a síntese e secreção de citocinas é, no mínimo, inusitado. Citocinas são importantes moléculas de defesa humana, apresentando função importante nos sistemas de reconhecimento e ataque a agentes invasores. Uma possível explicação para isso, é que hiperestimulando vias de integração de sinais, a bactéria pode acabar confundindo o hospedeiro e prejudicando a organização e controle deste tipo de resposta. Inflamação pode ser um meio que a bactéria encontra para quebrar barreiras (endotélio e mucosas), facilitando sua invasão e a obtenção dos nutrientes que necessita para sobreviver. Determinadas bactérias, por outro lado, parecem perceber a periculosidade desta estratégia e resolvem, assim, bloquear a ação destas substâncias, ao invés de estimulá-las.

Algumas toxinas bacterianas induzem a produção de determinadas citocinas anti-inflamatórias ou inibem a produção de outras, de ação pró-inflamatória. Foi demonstrado que a toxina do cólera é um potente inibidor da secreção de IL-12, agindo sobre a transcrição de RNA. Linfostatina, uma toxina produzida por *E. coli* enteropatogênica, por sua vez, inibe a produção de IL-2, IL-4 e IFN γ . *Yersinia* inibe a síntese de TNF α , por um mecanismo de secreção do tipo III, bloqueando a degradação de I κ B. *L. monocytogenes*, por outro lado, ativa NF- κ B como uma estratégia para aumentar sua patogenicidade. Ativação de NF- κ B em células endoteliais, induzida por *L. monocytogenes*, resulta em aumento na expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e E-selectina) e secreção de IL-8 e MCP-1, o que leva a diapedese e infiltração local de células fagocíticas. Desta forma, utilizando o fagócito como

Mecanismos bacterianos de evasão
um “cavalo de Tróia”, *Listeria monocytogenes* consegue invadir o espaço subendotelial, facilitando, assim, a própria disseminação.

Recentemente, ademais, foi identificada uma região no genoma de *M. tuberculosis*, ausente em *M. bovis*, que codifica um sistema de secreção capaz de secretar toxinas que inibem a produção de IL-12.

Por fim, a ação de citocinas pode ser modulada, ainda, por proteólise. Diversas citocinas, tais como IL-1 β e TNF α , são produzidas na forma inativa, necessitando da clivagem de proteases para serem ativadas. Diversas bactérias são capazes de produzir enzimas semelhantes, com capacidade de ativar tais citocinas. Proteases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*, por outro lado, são capazes de inativar IFN γ e TNF α . Foram identificadas, também, proteases com capacidade de clivar receptores de citocinas, tais como IL-6, impedindo a célula de responder a tais ligantes.

As bactérias, ademais, desenvolveram diversos modos de evasão do sistema do complemento. Polissacárideos da cápsula de *Streptococcus agalactiae* contêm ácido siálico e tais resíduos impedem a ativação da via alternativa do complemento e depósito de C3b na superfície bacteriana. Existem evidências de que várias bactérias produzem proteases, capazes de inibir as vias do complemento. Por exemplo, *Streptococcus agalactiae* codifica um enzima que inativa, por proteólise, a anafilatoxina C5a. *Pseudomonas aeruginosa*, por sua vez, produz uma elastase que inativa C3b e C5a.

Existem proteínas, chamadas reguladores da ativação do complemento, que modulam a ação deste sistema, a fim de que não permaneça ativado de maneira descontrolada. Sabe-se, hoje, que certas bactérias adquiriram a capacidade de se ligar a tais reguladores,

conseguindo, assim, manipular suas atividades biológicas e, desta forma, previnem o depósito de C3b em suas superfícies, bloqueando assim a própria fagocitose.

Bactérias conseguem escapar, tanto da fagocitose que independe de opsonização prévia, quanto da fagocitose opsonino-mediada. *Yersinia spp.*, por exemplo, por um sistema de secreção do tipo III, injeta toxinas dentro do fagócito, inibindo o processo de fagocitose. *Salmonella spp.* e *Shigella spp.* entram no macrófago e induzem apoptose. Outras bactérias, ainda, são capazes de invadir o macrófago e sobreviver dentro de diversos compartimentos do mesmo.

Pseudomonas aeruginosa, pela injeção da exoenzima S no interior da célula eucariótica, por um sistema de secreção do tipo III, é também capaz de inibir sua fagocitose. *Salmonella typhimurium*, injetando a toxina SipB, induz apoptose de macrófagos. A segunda ilha de patogenicidade desta bactéria (SPI-2) está envolvida na inibição da ativação do sistema NADPH oxidase, parecendo interferir, também, com o tráfego de endossomos.

Ehrlichia equi apresenta a surpreendente capacidade de habitar neutrófilos. Pouco se sabe sobre os mecanismos que permitem sua sobrevivência no interior deste tipo celular.

Certas bactérias conseguem viver dentro de macrófagos e monócitos. *Coxiella burnetti* e *Salmonella typhimurium* conseguem, até mesmo, sobreviver no acidificado compartimento lisossomal. O mecanismo para sobreviverem em meio com pH igual a 5 permanece desconhecido. Outras, tais como *Mycobacterium spp.* e *Nocardia spp.*, inibem a maturação normal do compartimento endossômico. O pH de vacúolo contendo *M. tuberculosis*

permanece entre 6.3 e 6.5. A estratégia, por meio da qual este microrganismo consegue elevar o pH do vacúolo, ainda não foi desvendada.

Determinadas bactérias, como *Legionella pneumophila*, são capazes de desenvolver um compartimento especializado, que não permite contato do aparato vacuolar. Esta forma particular de fagossomo permite a sobrevivência da bactéria no seu interior por períodos prolongados.

Catalases, superóxido dismutases e peroxidases bacterianas são capazes de converter espécies reativas do oxigênio, produzidas pelo hospedeiro, em substâncias menos tóxicas. Enzimas bacterianas, capazes de detoxificar espécies reativas do oxigênio, são igualmente descritas e incluem NO[•] redutase, peroxinitrito redutase e S-nitrosoglutationa redutase.

Tióis de baixo peso molecular são importantes na degradação de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, assim como na reversão de modificações protéicas, induzidas por tais substâncias. Glutathione é o tiol de baixo peso molecular predominante em bactérias entéricas.

Outras estratégias, utilizadas pelas bactérias, para evadirem do ataque causado por espécies reativas, incluem compartimentalização e controle dos estoques de ferro, assim como ativação, via oxidação de proteínas reguladoras, de fatores de transcrição que controlam genes envolvidos em resistência a stress oxidativo.

Bactérias simbióticas da flora intestinal podem se tornar altamente virulentas, ao obterem acesso para a corrente sanguínea. *E coli*, em particular, desenvolveu diversos mecanismos para sobreviver neste tipo de ambiente (230).

Helicobacter pylori produz uma toxina, VacA, que causa distúrbios no tráfego de vacúolos endossômicos e na apresentação de antígenos via MHC-II.

Acredita-se que *Mycobacterium tuberculosis* seja capaz de bloquear o processamento antigênico. Inibição da ativação de macrófagos ou da expressão de moléculas do MHC-II, por exemplo, são exemplos de mecanismos sugeridos e, atualmente, em investigação. *Chlamydia trachomatis* diminui os níveis de HLA-DR e HLA-DM em células infectadas.

As bactérias apresentam proteínas com a habilidade de se ligarem a anticorpos do hospedeiro. A mais bem conhecida delas é a proteína A, produzida por *Staphylococcus aureus*. A proteína A permanece ancorada à parede celular e tem a capacidade de se ligar à porção Fc de moléculas de IgG. O anticorpo, ficando ligado à bactéria por sua porção Fc, se torna incapaz de interagir com receptores Fc de fagócitos, o que acarreta em inibição da fagocitose de *S. aureus*.

Proteína G, por sua vez, é uma proteína de superfície produzida por estreptococos, que também se liga à porção Fc de IgG. Além de inibir fagocitose Fc-mediada, parece também interferir na ativação da cascata do complemento.

Staphylococcus e *Streptococcus* se sobressaem, em geral, pela sofisticada habilidade e pelo alto potencial invasivo que desenvolveram evolutivamente (231). Tais mecanismos facilitam o desenvolvimento de infecções invasivas severas, tais como fasciite necrotizante, sepse e Síndrome do Choque Tóxico (232, 233).

Os anticorpos, geralmente, reconhecem moléculas presentes na superfície das bactérias. Algumas bactérias, entretanto, por variação antigênica, conseguem evadir deste reconhecimento. Um exemplo de variação antigênica ocorre em pili de *Neisseria gonorrhoeae*. Este organismo, causador de gonorréia, utiliza pili para aderir às células do hospedeiro que são fortemente imunogênicos. No intuito de não serem reconhecidas, as bactérias são capazes de recombinar os genes que codificam tais proteínas, dando origem a um número extremamente grande de variantes antigênicas.

Staphylococcus aureus modifica seu principal lípide de membrana, fosfatidilglicerol, inserindo lisina e adicionando D-alanina ao ácido teicóico. Ambas as modificações reduzem a carga negativa da membrana, diminuindo sua susceptibilidade a peptídeos antimicrobianos. Similarmente, bactérias gram-negativas podem modificar a estrutura do seu LPS. Por exemplo, *S. enterica* pode originar lípide A hepta-acilado e modificar seus grupos fosfato, com etanolamina e aminoarabinose, diminuindo, assim, sua susceptibilidade a peptídeos antimicrobianos ou à polimixina.

Diversas outras bactérias podem alterar a estrutura do próprio LPS, para se camuflarem do reconhecimento por TLRs ou por peptídeos antimicrobianos. *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, altera a estrutura do seu LPS, durante o curso da infecção. Enquanto na fase inicial, o LPS apresenta seu lípide A penta-acilado, em fase tardia, o mesmo se encontra hexa-acilado. Sendo a forma hexa-acilada, um indutor 100 vezes mais potente de secreção de $\text{TNF}\alpha$ e IL-8, quando comparado à forma penta-acilada, a bactéria é capaz de modular a resposta inflamatória que ocasiona,

conseguindo induzir menor resposta imune na fase inicial, o que lhe permite proliferar e utilizar o dano tecidual consequente como fonte de nutrientes.

A toxina do Anthrax, produzida pelo *Bacillus anthracis*, interrompe diversas proteínas da família das MAPK quinases (MAPKK). Tal toxina entra em macrófagos, por “lipid rafts”.

Os micro-domínios lipídicos, conhecidos como “lipid rafts”, podem ser encontrados na membrana plasmática ou nas membranas endossômicas de células eucarióticas. Estas regiões dinâmicas são caracterizadas por insolubilidade a detergentes e baixa densidade, sendo ricas em colesterol, glico-esfingolipídeos e proteínas ancoradas por glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Cavéolas são um subgrupo de “lipid rafts”, caracterizados por sua morfologia, semelhante a um “frasco”. Além disso, cavéolas apresentam na sua constituição a proteína caveolina, que forma uma camada sobre a invaginação que dá formato a esta estrutura.

“Lipid rafts” parecem ter diversas funções, que incluem secreção polarizada, transporte de membrana, transcitose, etc. Apesar dos “lipid rafts” serem um pequeno percentual da composição da membrana, sua estrutura rica em moléculas de sinalização os transformam em alvos para sabotagem bacteriana. Ainda, sendo estruturas que sofrem um forma particular de endocitose, representam um veículo por meio do qual a bactéria pode tentar invadir a célula (234).

Foi demonstrado que as *Escherichia coli* que expressam a adesina FimH, invadem mastócitos via “lipid rafts”, conseguindo sobreviver no interior deste tipo celular dentro de vacúolos ricos em tal estrutura.

Outro patógeno que parece entrar na célula por meio de “lipid rafts” é o *Campylobacter jejuni*, já que quelantes de colesterol (substâncias capazes de romper as cavéolas) são capazes de inibir a entrada destas bactérias no interior de células epiteliais.

As interações entre os vacúolos derivados de “lipid rafts” e o sistema endossômico são pobremente compreendidas e, portanto, desconhece-se os mecanismos, pelos quais as bactérias que se encontram dentro destas estruturas, evadem dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Determinadas proteínas sintetizam proteínas que reconhecem tanto os domínios V β do TCR, quanto proteínas do MHC de classe II. Tais proteínas são chamadas de superantígenos (235).

O superantígeno mais bem conhecido é a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) 1. Ao interagirem com domínios V β do TCR e com proteínas do MHC de classe II, os superantígenos ativam, tanto as células apresentadoras de antígenos, quanto os linfócitos T. Desta forma, até mais do que 50% dos linfócitos T podem ser ativados. Tal ativação, não sendo restrita ao MHC, no sentido clássico, resulta em potente resposta inflamatória.

Após ativados por superantígenos, os linfócitos T podem entrar em proliferação clonal ou sofrer apoptose. Proliferação clonal, em geral, é seguida de uma fase na qual os linfócitos se tornam anérgicos. Em ambos os casos, proliferação clonal ou apoptose, a via final acaba sendo a perda de grande número de linfócitos.

Manipulação de vias de divisão celular e apoptose são formas comuns de evasão das defesas do hospedeiro. Dentre as proteínas moduladoras do

ciclo celular, temos: inibidores da progressão do ciclo celular ou estimuladores da proliferação celular.

O mais prevalente dos inibidores de ciclo celular é a toxina distensora citoletal (CDT – *cytolethal distending toxin*), produzida por um grande número de bactérias gram-negativas. Esta proteína inibe a proliferação de linfócitos T.

Algumas bactérias produzem proteínas que induzem proliferação celular. *Pasteurella multocida*, por exemplo, produz uma toxina chamada PMT que é um potente mitógeno.

Inicialmente, surgiram evidências de que bactérias são capazes de induzir apoptose de células eucarióticas. Hoje, já se sabe que elas conseguem também inibir este processo, para sobreviver dentro da célula por um período mais prolongado.

Uma das maneiras, pela qual a bactéria induz apoptose da célula hospedeira, é ligando-se a receptores de membrana, conhecidos como “death receptors”. Tais receptores constituem uma família, composta pelo receptor de TNF (TNFR1), CD95 (Fas/APO), DR3 (death receptor 3, também conhecido como APO-3 ou TRAMP), DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2/KILLER/APO-2) e DR6.

Existem, ainda, diversos mecanismos que controlam as vias deflagradas por tais receptores. Tais mecanismos incluem: inibição do recrutamento de caspases, inibição da ativação proteolítica de pró-caspases e inibição da atividade de determinadas caspases. Bactérias são capazes de produzir toxinas semelhantes a estas proteínas, interferindo, assim, a seu favor, no controle do processo de apoptose.

As bactérias têm duas razões para modular o processo de apoptose:

eliminar leucócitos e sobreviver dentro de determinadas células. *Helicobacter pylori*, por exemplo, é capaz de induzir a produção de Fas por células mononucleares, pela ativação da síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$.

Toxinas formadoras de poros, presentes em *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* e diversas outras bactérias, causam morte celular por apoptose e são capazes de sabotar o sistema imune de inúmeras outras formas (236-239). As toxinas AB de *Corynebacterium diphtheriae*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* e *Shigella dysenteriae*, inibem síntese de proteínas e são, igualmente, associadas a morte celular por apoptose e outros mecanismos de evasão (240-243).

Shigella flexneri produz toxinas, injetadas no interior da célula por mecanismo de secreção do tipo III, conhecidas como IpaA, IpaB, IpaC e IpaD. Experimentos realizados com tais toxinas identificaram que IpaB é capaz de induzir apoptose de macrófagos. IpaB age ativando a pró-caspase 1.

Salmonella typhimurium também induz apoptose de macrófagos, por mecanismo de secreção do tipo III. A toxina implicada, neste caso, parece ser (Sip)B, que tem homologia significativa com IpaB.

Menos claro, entretanto, é o mecanismo pelo qual *M. tuberculosis* induz apoptose de células eucarióticas. Foi sugerido que componentes da parede celular desta bactéria, tais como lipoproteínas, seriam capazes de induzir apoptose celular via TLR-2, por ativação de vias dependentes de caspase-1 ou por manipulação dos níveis celulares de Bcl-2.

Diversas bactérias sobrevivem no interior de células invadidas, permanecendo no citosol ou no interior de vacúolos. Inibição do processo de apoptose parece um mecanismo óbvio, desenvolvido pelas bactérias, no intuito de conseguirem prolongar sua estadia neste habitat. O primeiro relato, neste sentido, foi o de que células infectadas por *Chl. trachomatis* são mais resistentes à ação de uma gama de substâncias, indutoras de apoptose, quando comparadas a células não-infectadas (244).

Cepas virulentas de *M. tuberculosis* induzem menos apoptose de macrófagos do que cepas não-virulentas. Esta diminuição pode ser devido à indução da síntese de IL-10, assim como à clivagem do receptor de TNF, o TNFR-2, ocorrendo, assim, neutralização do sinal pró-apoptótico induzido pelo seu respectivo ligante.

5 Objetivos

5.1. Objetivos gerais

- Determinar variáveis que possam ser utilizadas como biomarcadores em pacientes críticos, com especial atenção para aquelas que possam ser usadas para diagnóstico e/ou monitorização da evolução e tratamento de pacientes sépticos.
- Avaliar o valor dos marcadores de infecção identificados, buscando racional em termos de sinalização intra-celular e fisiopatologia da sepse.
- Estudar particularidades da sepse em determinadas populações de pacientes, tais como no indivíduo idoso, no obeso, no nefropata, no diabético e no paciente com trauma grave.

5.2 Peptídeos Antimicrobianos

Além de focarmos nas catelicidinas e nas defensinas alfa e beta, pretendemos estudar também o receptor de vitamina D (VDR), no intuito de compreender como este sistema participa da defesa imune em sepse, expandindo nosso conhecimento sobre a fisiopatologia desta doença e procurando moléculas envolvidas nestas vias de sinalização que possam ser usadas como marcadores de infecção. Tal abordagem inclui tanto experimentos clínicos, quanto em modelo animal.

Pretendemos, ainda, aprofundar nosso conhecimento sobre o fenômeno de translocação nuclear de catelicidinas em sepse e verificar se o mesmo também ocorre em humanos e outras doenças complexas.

Nosso objetivos, portanto, são:

- Repetir os experimentos de translocação nuclear de CRAMP em

neutrófilos humanos de pacientes sépticos e pesquisar se LL-37 pode ser localizado no núcleo celular;

- Realizar marcação imuno-histoquímica de células de câncer (tumores de mama, ovário, cólon, melanoma e pâncreas) e análise por microscopia confocal, para sabermos se em linhagens tumorais LL-37 também transloca para o núcleo celular;

- Realizar experimentos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP);
Pelos experimentos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP),

acreditamos que será possível desvendar detalhes sobre o papel dos peptídeos antimicrobianos no núcleo celular em sepse e câncer, assim como outros aspectos inusitados do que ocorre neste compartimento celular na vigência de um Choque Séptico.

- Investigar os níveis de expressão gênica e os valores séricos de LL-37, α -defensinas, β -defensinas e vitamina D em pacientes sépticos;
- Realizar experimentos de transcriptômica, metabolômica, proteômica e lipidômica em camundongos deficientes em CRAMP submetidos a modelo de punção e ligadura cecal.
- Investigar o papel dos peptídeos antimicrobianos em populações particulares de pacientes, tais como no indivíduo idoso e no paciente politraumatizado;
- Investigar as funções imunorregulatórias dos peptídeos antimicrobianos em doenças inflamatórias não-infecciosas, tais como pancreatite aguda e lúpus eritematoso sistêmico.

5.3 Receptores Fc de Imunoglobulinas

Investigar:

- Peptídeo expresso por *E. coli* e capaz de se ligar de maneira opsonino-independente ao CD16. Para atingir tal objetivo, estabelecemos colaboração com o Laboratório do **Prof. Dr. Ricardo Giordano** (Instituto de Química da Universidade de São Paulo) para realização de

experimentos de *phage display*, técnica capaz de atingir tal objetivo. Os experimentos estão sendo realizados pela Doutoranda **Jaqueline Beppler**.

- Investigar se as bactérias são capazes de induzir este tipo de sinalização inibitória em outros receptores Fc, tal como o receptor de IgA (CD89). Resultados ainda não-publicados do nosso grupo demonstram que o germe gram-positivo *Streptococcus pneumoniae* se liga ao FcαRI, induzindo sinalização ITAM inibitória.
- Investigar se polimorfismos do receptor CD16 e CD32 estão associados a maior mortalidade em pacientes sépticos.
- Ampla análise de vias de sinalização induzida pelos receptores CD89 e CD16, após ativação celular bactéria *E. coli* ou outras bactérias. Neste caso, poderemos usar tanto modelos *in vitro* ou *in vivo*. O material coletado será enviado para obtenção de dados em larga escala, por técnicas de transcriptômica, metabolômica, lipidômica e proteômica. Para experimentos de transcriptômica, estabelecemos colaboração com o laboratório do **Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis** (Instituto de Química da Universidade de São Paulo), renomado pesquisador da área de Biologia de Sistemas e Bioinformática. Para os experimentos de metabolômica, lipidômica e proteômica, estamos trabalhando em colaboração com a equipe do **Prof. Dr. Carlos Alberto Labate**, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Genética, Laboratório Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia da Universidade de São Paulo.

- Desenvolver novas armas terapêuticas para a sepse, pelo bloqueio da interação bactéria-receptor e/ou da via ITAM inibitória (ITAMi).

Todos os nossos estudos sobre o papel dos receptores Fc em sepse são, cabe lembrar, realizados em estreita colaboração com o laboratório de Pesquisa do **Prof. Dr. Renato Costa Monteiro**, localizado na Faculté Xavier Bichat, Université Paris VII, Paris, França. A nossa parceria Brasil-França inclui acordo de cooperação internacional assinado entre a FAPESP e a “Agence Nationale de la Recherche” (ANR) e recebemos apoio financeiro de ambas as instituições (Projeto Temático FAPESP # 2012/51468-0).

Pretendemos, nesse projeto, abordar dois aspectos fundamentais da doença: a busca de um melhor conhecimento sobre seus mecanismos fisiopatológicos e a procura de biomarcadores que sirvam para nortear diagnóstico e tratamento. Para alcançar tal objetivo, estamos utilizando uma abordagem temporal, na qual um fator fundamental é o acompanhamento dos pacientes, desde sua entrada na Unidade de Terapia Intensiva até a alta hospitalar ou óbito. Dessa maneira, obtemos dados sobre variáveis metabólicas, celulares e moleculares de pacientes não infectados que, eventualmente, desenvolvem sepse. Tais estudos serão complementados por experimentos em animais de pequeno porte (ratos e camundongos) e *in vitro*.

O foco molecular são a família dos Peptídeos Antimicrobianos e a família dos receptores Fc de imunoglobulinas, porém qualquer via de sinalização ou molécula que nos parecer um potencial biomarcador de sepse será investigada exaustivamente.

O presente projeto engloba objetivos amplos, tendo como ponto central o estudo da sepse, e irá envolver inúmeros alunos e colaboradores. Relembro isso, porque acreditamos que, direta ou indiretamente, esse projeto nos ajudará também a atingir todos os objetivos abaixo.

5.4 Ensino

Graduação

- Ampliação do número de alunos de Iniciação Científica no nosso laboratório;
- Fomento à vinda de alunos estrangeiros e intercâmbio com universidades de outros países e do Brasil;

Pós-graduação

- Ampliação do número de pós-graduandos (mestrado e doutorado) no nosso laboratório;
- Ampliação dos cursos ministrados pelos atuais docentes para alunos de pós-graduação e da massa crítica no estímulo a novas ideias;
- Fomento à vinda de alunos estrangeiros e intercâmbio com universidades de outros países;
- Estabelecimento de intercâmbio com outras universidades do Brasil;
- Estabelecimento de teses de Doutorado em co-tutela e estágios de pós-doutorado no exterior;

5.5 Pesquisa e Captação de Recursos

- Consolidação de estrutura laboratorial que permita estudos de integração da pesquisa clínica com a pesquisa básica, criando projetos

que possibilitarão obter das agências de fomento à pesquisa, aparelhos de última geração para o nosso laboratório (sequenciador de DNA, aparelhos Miliplex, etc);

- Incremento das atividades no nosso laboratório;
- Desenvolvimento dessa nova linha de pesquisa e de novos projetos;
- Detecção de novos biomarcadores em pacientes críticos, com especial atenção para aqueles que possam ser usados para diagnóstico e/ou monitorização da evolução e tratamento de pacientes sépticos;
- Fortalecimento do trabalho em colaboração científica com o laboratório do **Prof. Dr. Renato Costa Monteiro** (Paris, França);
- Fortalecimento do trabalho em colaboração científica com o laboratório do **Prof. Dr. Victor Nizet** (San Diego, Estados Unidos da América);
- Investigação de vias de sinalização celular e fisiopatologia da sepse e outras doenças complexas;
- Desenvolvimento de novos fármacos;
- Desenvolvimento de vacinas para sepse e outras doenças infecciosas;

5.6 Extensão

- Criação de cursos de inglês, ministrados no próprio hospital, para médicos e alunos de pós-graduação, no intuito de fomentar apresentação de trabalhos científicos em congressos internacionais e publicação de artigos em inglês;
- Criação de cursos de estatística e ciência da computação, ministrados no próprio hospital, para médicos e alunos de pós-graduação, no intuito

de fomentar apresentação de trabalhos científicos em congressos internacionais e publicação de artigos;

- Organização de congressos, cursos de curta duração, simpósios e demais encontros acadêmico-científicos;
- Organização de aulas, cursos, palestras e seminários de formação continuada e atualização para os plantonistas das nossas Unidades de Terapia Intensiva, médicos-residentes e preceptores.

6 Pacientes e métodos

No que se refere a estudos clínicos, o presente projeto envolverá a coleta de sangue periférico de todos os pacientes que derem entrada nas UTIs da Disciplina de Emergências Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Pacientes cirúrgicos, politraumatizados e síndromes coronarianas são, usualmente, admitidos em outras UTIs do nosso hospital. Isso torna a perfil dos pacientes das UTIs da Disciplina de Emergências Clínicas bastante homogêneo. Sepses, acidente vascular cerebral, pacientes admitidos por alteração do nível de consciência, edema pulmonar e asma/DPOC compõem mais do que 90% das causas de internação dos pacientes incluídos neste nosso estudo.

Os critérios de exclusão são: pacientes com AIDS, em fase terminal, menores de 18 anos de idade e aqueles que se negaram a assinar o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido). Os demais pacientes são divididos em 4 grupos: 1) grupo UTI controle (pacientes admitidos na UTI por causas não-infecciosas); 2) grupo sepse severa (pacientes admitidos na UTI por sepse severa ou aqueles que desenvolveram sepse severa durante a internação na UTI); 3) grupo choque séptico (pacientes admitidos na UTI por choque séptico ou que desenvolveram choque séptico durante a internação na UTI); grupo em fase de resolução (pacientes que sobreviveram a um episódio de choque séptico e estão há pelo menos 48 horas sem necessidade de vasopressores). Sepses severas e choque séptico foram definidas de acordo com o consenso proposto em 1992 (12).

Esta parte do projeto, utilizando material humano, tem sido em grande parte financiada por um auxílio que recebo da FAPESP (Projeto Jovem Pesquisador # 2009/17731-2). Recentemente, além disso, comecei a receber também o apoio financeiro do CNPq (Edital Universal 470539/2013-15).

O sangue é fracionado, sendo estocado o seguinte material: plasma, neutrófilos, fração linfo-monocitária, sangue total para extração de DNA e glóbulos vermelhos. O material coletado está sendo submetido a inúmeras técnicas laboratoriais, visando-se a determinação de potenciais biomarcadores, presentes no plasma, no RNA ou no DNA genômico. A coleta deste material ocorre em paralelo com o preenchimento de um banco de dados clínico-laboratoriais do paciente. O material colhido é, também, utilizado para obtenção de dados em larga escala, por meio de técnicas de sequenciamento, microarray, proteômica, metabolômica, etc.

6.1 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo # 1207/09). Sub-projetos que surgiram após esta aprovação foram igualmente submetidos para análise e aguardam parecer final para serem iniciados. Todos os pacientes incluídos neste estudo, ou seus familiares próximos, assinaram um termo de consentimento.

6.2 Técnicas de ELISA e Miliplex®

As concentrações de dezenas de citocinas (IL-6, TNF α , IL-10, TGF β , etc), peptídeos antimicrobianos e outras proteínas de interesse estão sendo

determinadas, utilizando-se kits de ELISA de alta sensibilidade (R&D systems, USA) ou Miliplex® (Millipore, USA), conforme as especificações do fabricante.

6.3 Técnica de PCR quantitativo

cDNA é sintetizado a partir de lisados celulares de neutrófilos e fração linfo-monocitária, sendo, então, realizado PCR quantitativo para análise das moléculas de interesse.

6.4 Immunoblotting

Após a eletroforese em SDS-PAGE 12,5% do lisado celular, é realizada transferência eletroforética para membranas de nitrocelulose, utilizando o tampão Tris-Glicina-Metanol (tris 2,42 g, glicina 11,26g, metanol 200 ml, água q.s.p. um litro) e corrente de transferência. As membranas são incubadas em um tampão de bloqueio composto por Tris-HCl 25 mM pH 7.4, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM (TBS) com albumina sérica bovina (BSA) 3%, vermelho fenol e Tween 20 0.1% por duas horas a temperatura ambiente, e então incubadas com o anticorpo primário por mais duas horas. Após as lavagens habituais, incubação com anticorpo secundário ocorre por mais uma hora. São realizadas três lavagens por dez minutos em agitação com TBS + 0,3% BSA + 0,1% Tween 20 entre as incubações. Para detecção da proteína de interesse, é utilizado SDS-PAGE 10% e utilizado o mAb primário e um anticorpo secundário conjugado a HRP (diluição 1:3000). A leitura da marcação na membrana ("blot") utiliza o sistema de quimiluminescência amplificada (ECL) e filme Kodak para auto-radiografia.

6.5 Phage Display

Descrita inicialmente por Smith (245), o termo define uma técnica de clonagem que permite a expressão de diversas sequências de peptídeos na superfície de bacteriófagos (fagos), e a seleção destas, com base na afinidade por uma molécula-alvo (246). Esta técnica de seleção em que uma biblioteca de peptídeos ou proteínas é expressa na superfície de fagos, contendo material genético codificante para cada peptídeo localizado no genoma viral, é denominada *Phage Display* (247). É uma técnica que permite ensaios de seleção de peptídeos contra diferentes alvos em diferentes situações. Ensaios de seleção de peptídeos (chamados *panning* ou *biopanning*), por exemplo, podem ser realizados *in vitro* contra moléculas-alvo aderidas em superfície, células que podem ou não ser estimuladas para alterar a expressão de receptores, tecidos dissecados. Ensaios também podem ser realizados *in vivo*, injetando-se os fagos na circulação do animal, retirando-se os órgãos de interesse e selecionando os fagos que expressam peptídeos que interagem com a vasculatura de diferentes órgãos do organismo (245, 247).

Esta técnica se baseia na construção de bibliotecas de bacteriófagos filamentosos, onde pequenos peptídeos (entre 5 e 15 aminoácidos) são apresentados numa das proteínas do capsídeo viral (245).

Bacteriófagos são partículas virais pertencentes à família *Inoviridae* que infectam algumas bactérias gram-negativas, usando o pilus sexual como receptor. As partículas destes fagos (linhagens M13, f1 e fd) que infectam, via pilus F, a *Escherichia coli* são formadas por DNA de fita simples (ssDNA),

envoltos por uma cápsula protéica, e contendo as proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. São estes os fagos filamentosos do gênero *Inovirus* que são preferencialmente empregados no *Phage Display*, porque estes fagos induzem na célula da *E. coli* um estado no qual ela produz e secreta continuamente partículas virais sem sofrer lise, possibilitando assim a obtenção de um grande número de fagos (248-251).

Das cinco proteínas do fago, as mais utilizadas para apresentar peptídeos são a pIII e pVIII. A pIII é responsável pela formação do corpo cilíndrico do capsídeo, apresenta 3-5 cópias por vírion, é sintetizada com um sinal no peptídeo N-terminal (clivado na translocação na membrana interna) e, quando madura, possui 406 aminoácidos. A porção C-terminal se encontra no citosol e a N-terminal se encontra no periplasma, permitindo a inserção de longos fragmentos. Já a síntese da pVIII necessita processamento para que ocorra sua inserção na membrana citoplasmática da célula bacteriana hospedeira. Quando madura, possui 50 aminoácidos, sendo que até 6 aa podem ser inseridos nela sem seu rompimento (252).

Uma biblioteca é um pool de microrganismos que expressam diferentes polipeptídeos, e cada microrganismo carrega uma sequência de DNA ou RNA codificante para dado peptídeo, representando um clone. Cada clone presente na biblioteca pode ser propagado, expressando o mesmo peptídeo (252).

A eficácia da seleção por *Phage Display* está diretamente relacionada com a complexidade da biblioteca utilizada (quanto maior for a diversidade de clones dentro da biblioteca, maior a probabilidade de se encontrar um ligante

para a molécula alvo). Uma biblioteca de *Phage Display* pode conter mais de 10^8 diferentes peptídeos o que resulta em ligantes para virtualmente qualquer alvo biológico (253).

Entre as vantagens da utilização do *Phage Display* podemos citar a ligação direta que existe entre fenótipo experimental e genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados (249), a habilidade de selecionar ligantes de alta afinidade, a possibilidade de produzir proteínas solúveis, o baixo custo e o fácil manuseio (251). Esta técnica pode levar à produção de uma alta variedade de ligantes, incluindo anticorpos recombinantes e peptídeos. Além disso, pode beneficiar diagnóstico, pela produção de moléculas. Essas características do *Phage display* permitem identificar alvos terapêuticos e diagnósticos em diversos processos biológicos de um organismo e isolar e caracterizar peptídeos antagonistas ou agonistas dos alvos identificados (247, 254).

As bibliotecas utilizadas neste projeto foram produzidas no laboratório de Biologia Vascular do Instituto de Química da USP pela **Dra. Jussara Michaloskie**, aluna de Pós-Doutorado do **Prof. Dr. Ricardo Giordano** e cedidas gentilmente para o presente estudo. Para a construção destas bibliotecas, foi utilizado o vetor fUSE5. A metodologia desenvolvida por George Smith (246), sofreu algumas modificações para obtenção de maior número de clones finais (253, 254). As bibliotecas construídas foram do tipo X6 e CX8C (X representa qualquer aminoácido e C representa cisteínas). O uso de bibliotecas lineares e cíclicas, de diferentes tamanhos, foi empregado para se aumentar a diversidade de peptídeos disponíveis.

Os fagos foram isolados e purificados do sobrenadante de cultura de bactéria (*E.coli* MC1061), precipitados pelo método de PEG/NaCl (245) e ressuspensos em PBS (pH 7.4). Os fagos foram titulados por diluição seriada em meio LB, infectados em *E.coli* K91kan, e semeados em LB-ágar contendo tetraciclina (20 µg/mL) e kanamicina (100 µg/mL). O número de unidades transdutoras de bactéria (TU) foi calculado, contando-se as colônias obtidas.

Para identificarmos peptídeos ligantes de FcγRIIIa (CD16a), as bibliotecas de fagos CX8C e X6 foram incubadas *in vitro* com a proteína recombinante de camundongo e a proteína recombinante humana da porção extracelular do receptor FcγRIIIA (CD16) (R&D Systems, EUA).

Os alvos FcγRIIIa humano e murino foram imobilizados em placas de 96-poços (500 µg/ml em PBS) durante toda a noite, a 4°C, bloqueados com PBS 3% BSA por 2 horas em temperatura ambiente e incubados com a biblioteca de fagos, em PBS com 3% VBB (*Vegetal Blocking Buffer*). Após 2 horas em temperatura ambiente, os poços foram lavados 10 vezes com PBS, e os fagos ligados aos receptores ou fatores imobilizados foram recuperados por infecção com *E.coli* K91kan. Diluições em série foram plaqueadas em meio LB-agar-tetraciclina/kanamicina para quantificação do número de fagos ligados a cada receptor. Ao final, os fagos obtidos foram sequenciados conforme descrito no item abaixo.

Ao final do *biopanning*, os fagos obtidos foram semeados em placas de LB-ágar-tetraciclina/kanamicina e colônias individuais selecionadas e ressuspensas em 50 µL de PBS. A região do DNA codificante para o inserto

de peptídeo foi amplificada, a partir de 2 µL desta suspensão em reação de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos específicos (forward 5'-CATGCC CGGGTA CCTTTC TATTCT C-3' e reverse 5'-CCCTCA TAGTTA GCGTAA CGATCT-3'). A reação de PCR foi conduzida nas seguintes condições: 35 ciclos de desnaturação (94°C, 15 segundos), anelamento (60°C, 30 segundos) e extensão (72°C, 1 minuto). Os produtos de PCR foram, então, sequenciados para identificação do peptídeo apresentado por cada fago selecionado.

Inicialmente, os peptídeos isolados foram analisados por métodos de bioinformática, utilizando-se *softwares* disponíveis na internet (ClustalW, Blast), na tentativa de se encontrar proteínas com sequências similares (similaridade de estrutura primária).

Para validar a interação peptídeo-receptor, foram realizados ensaios de ligação (*binding*). Os receptores foram imobilizados em placas de 96 poços (10 µg/ml em PBS) durante a noite, a 4°C, bloqueados com PBS 3% BSA ou VBB por 2 horas em temperatura ambiente e incubados com 10⁹ ou 10¹⁰ TU do fago a ser testado e de fagos controle (Fd-tet, sem inserto de peptídeo). Após 2 horas em temperatura ambiente, os poços foram lavados 10 vezes com PBS, e os fagos ligados aos receptores imobilizados recuperados por infecção com *E.coli* K91kan. Diluições em série foram plaqueadas em meio LB-ágar-tetraciclina para quantificação do número de fagos ligados a cada receptor.

6.6 Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) e ChIP-Seq

Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) é um tipo de técnica de

imunoprecipitação utilizada para se investigar a interação entre proteínas e DNA no núcleo celular. Destina-se a determinar as regiões gênicas onde uma determinada proteína de interesse se liga.

Resumidamente, o método é o seguinte: a célula é fixada com paraformaldeído e lisada, o DNA é sonicado e o lisado celular é submetido a imunoprecipitação. Após este passo, o DNA é eluído do material proteico podendo, então, ser sequenciado (ChIP-Seq). Identificam-se, assim, todas as regiões gênicas onde a proteína de interesse, no caso LL-37, se liga na cromatina.

Estudos de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) nos permitirão identificar os locais exatos no genoma da célula hospedeira onde, na vigência de sepse ou outra doença complexa, LL-37 se liga. Além de LL-37, iremos imunoprecipitar também o receptor de Vitamina D e o fator de transcrição NF- κ B.

A comparação das regiões genômicas controladas por estas moléculas (VDR e NF- κ B), assim como a demonstração de que LL-37 também se associa a DNA genômico, irão elucidar detalhes inusitados sobre a regulação gênica de vias que devem ter papel crítico em sepse e outras doenças complexas.

O ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) é utilizado para determinar se existe a ligação direta de um dado fator de transcrição a uma região promotora de interesse pela imunoprecipitação desta cromatina com anticorpo específico para o fator de transcrição (255). Acreditamos que LL-37 pode se comportar como fator de transcrição em células sépticas e em células

neoplásicas. Pretendemos, portanto, realizar experimento de imunoprecipitação de cromatina, pelos seguintes passos:

1. Pela cultura de células neoplásicas com adição de LL-37, estabelece-se a ligação entre esta catelicidina e o gene a ser pesquisado.
2. Em seguida, lisa-se a célula neoplásica por sonicação, para obtenção dos fragmentos de DNA.
3. Após a sonicação, a LL-37 ligada à cromatina é imunoprecipitada pela adição de um anticorpo específico para LL-37.
4. Lava-se e recupera-se, então, o complexo formado pela cromatina + LL-37 + anticorpo específico.
5. Elui-se a cromatina imunoprecipitada, provocando-se a ruptura da ligação entre LL-37 e a cromatina.

O sequenciamento do DNA obtido por imunoprecipitação, técnica conhecida como ChIP-Seq, mapea precisamente os sítios de ligação da proteína de interesse (256).

6.7 Imuno-histoquímica

A Imuno-histoquímica é uma técnica que possibilita localizar proteínas presentes em fragmentos de tecidos, pelo uso de um anticorpo conjugado a um marcador secundário. Pretendemos realizar marcação de peptídeos antimicrobianos com anticorpo específico, marcação secundária com anticorpo fluorescente e visualizar as células em microscópio adequado. No caso de experimentos de translocação celular, optamos por microscopia confocal para termos certeza absoluta do compartimento onde o peptídeo antimicrobiano se localiza.

6.8 Microscopia confocal

A microscopia confocal é ferramenta fundamental para a maioria dos estudos em biologia celular, pois permite a visualização da célula em três dimensões e a localização exata das proteínas de interesse no seu interior, assim como a visualização da interação entre proteínas, através de sua marcação com diferentes fluorocromos e DAPI.

6.9 Transcriptômica

Experimentos de DNA microarray estão sendo conduzidos em colaboração com a **Dra. Patricia Severino** (Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein, São Paulo). A análise dos resultados está sendo feita pela equipe do **Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis** (Instituto de Química, Universidade de São Paulo), especialista em transcriptômica e bioinformática.

DNA microarray é uma técnica que busca medir os níveis de expressão de transcritos em larga escala. Consiste num arranjo pré-definido de moléculas de DNA quimicamente ligadas a uma superfície sólida. Tais microarranjos são utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucleicos provenientes de amostras biológicas. Em geral, são utilizados microarranjos ordenados e contendo dezenas de milhares de sondas com sequências diferentes de modo a mapear todo ou quase todo o transcriptoma de uma espécie, geralmente espécies modelo. Durante a incubação, ocorre o pareamento específico entre alvos e sondas, se houver complementaridade de sequências. Após lavagem para remoção dos alvos não ligados, a quantidade de alvos hibridizados em cada sonda é determinada, utilizando-se

um leitor de lâminas que incide luz no comprimento de onda de excitação de cada fluoróforo e detecta a luz emitida. Iremos pesquisar RNAs codificadores e não-codificadores (microRNAs e RNAs longos).

Para avaliar a expressão de genes codificadores de proteínas e RNA não-codificadores (ncRNAs) será utilizado o microarranjo de DNA *SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray Kit* (Agilent, EUA). Tal kit contém 50.599 sondas que interrogam todos os genes codificadores de proteína anotados no genoma humano, além de lincRNAs (*Long intergenic Noncoding RNAs*) e TUCPs (*Transcripts of Uncertain Coding Potential*), compilados pelo Broad Institute – Massachusetts Institute of Technology (http://www.broadinstitute.org/genome_bio/human_lincrnas/). Para identificar os microRNAs, estamos utilizando o *miRNA Complete Labeling and Hyb kit* (Agilent, EUA).

As amostras de RNA de cada indivíduo são marcadas por fluorescência com o Cy3 e hibridizadas individualmente com uma amostra de RNA referência marcado com Cy5. O RNA referência consiste em um pool de RNA de diversos tecidos obtido comercialmente (*Universal Human Reference RNA*, Agilent, cat #740000).

Ao realizar os experimentos de microarranjo são obtidas tais imagens da fluorescência dos alvos que hibridizaram por complementaridade às sondas depositadas na placa. Estas serão inicialmente processadas com auxílio do programa *Feature Extraction* (Agilent), para obtenção dos valores de intensidade de expressão de cada sonda. A partir da intensidade associada a cada sonda, pode-se inferir a abundância relativa do RNA

correspondente na amostra (257, 258). Para cada sonda, o programa calcula razões entre as intensidades da amostra teste e da referência, e utiliza a abordagem LOWESS para corrigir diferenças nas medidas de intensidade associadas a diferenças associadas aos diferentes fluoróforos utilizados (diferentes eficiências de incorporação, diferenças de emissão de fluorescência), conforme recomendado na literatura em experimentos de duas cores (259).

Para determinar a significância estatística de mRNAs, RNAs não-codificantes longos (lncRNAs) e microRNAs diferencialmente expressos em cada um dos grupos de estudo está sendo utilizada a abordagem *Significance Analysis of Microarrays* (260), implementada no ambiente R.

Uma vez determinados os mRNAs diferencialmente expressos, estes serão anotados funcionalmente no *Gene Ontology* (GO) (261) e categorias gênicas e vias enriquecidas são identificadas com o auxílio das ferramentas BinGO (262) e DAVID (263).

Pelos perfis de expressão gênica obtidos, é estudada a co-regulação em *cis* e em *trans* entre os lncRNAs e mRNAs observados, evidenciando lncRNAs candidatos a desempenhar papéis regulatórios que serão posteriormente estudados experimentalmente. Para identificar eventos de regulação em *cis* mediada por ncRNAs, é investigada a existência de associação entre a expressão de lncRNAs e mRNAs codificadores de proteína, localizados na vizinhança 3' ou 5' em relação ao lncRNA diferencialmente expresso.

Evidências recentes indicam que muitos lncRNAs atuam em loci gênicos distantes de onde são transcritos, regulando em *trans* a expressão gênica (264). Para identificação de mRNAs que sejam possíveis alvos de regulação por lncRNAs em *trans*, iremos utilizar a abordagem de análise de mapa de módulos empregada por Hung e colegas (265). Nesta abordagem, busca-se identificar categorias gênicas enriquecidas em genes co-expressos com lncRNAs. Após selecionar genes diferencialmente expressos durante a diferenciação (mRNAs e lncRNAs), calcula-se a correlação de Pearson entre a expressão de todos os pares de genes diferencialmente expressos. Utilizando o programa *Genomica* (<http://genomica.weizmann.ac.il>) (266) para a construção de mapas de expressão, os genes são anotados com termos do *Gene Ontology* e com termos de vias metabólicas e de sinalização, extraídos da base de dados *Molecular Signatures Database* (www.broadinstitute.org/gsea/msigdb). Categorias gênicas significativamente afetadas pela expressão de lncRNAs são definidas, utilizando-se um *p* valor < 0.05, determinado pela distribuição hipergeométrica. São desenvolvidos scripts na linguagem de programação Python, para processamento dos dados utilizados nas análises de correlação.

Para identificar os microRNAs envolvidos na regulação dos genes estudados, pode-se fazer uso do banco de dados gerado por miRWalk. É um banco de dados gerado tanto pelo catálogo de miRNAs curados, aqueles nos quais já se possui evidência experimental de sua função, quanto o de previstos. Estas previsões são feitas, tanto por uma análise que leva em conta critérios termodinâmicos, envolvendo a interação entre nucleotídeos, quanto

por critério evolutivo, em que são observadas regiões conservadas, e semelhanças entre outros casos já observados. Ao todo, 9 diferentes algoritmos são analisados (267).

A fim de facilitar a caracterização e anotação dos lncRNAs detectados ao longo do projeto são compiladas as seguintes informações:

- Sua coordenada genômica.
- A estrutura de exons/introns.
- Marcas de cromatina ativadoras (H3K4me3 e H3K36me3).
- A presença ou ausência de genes presentes nos sentidos *upstream* e *downstream* do lncRNA.
- Potencial codificador usando a *CPC – Coding Potential Calculator*.
- Estruturas secundárias, usando os programas RNAz (268) e EvoFold (269)

Estas informações são agregadas às informações de expressão gênica de mRNAs, lncRNAs e microRNA compiladas em um banco de dados relacional, a ser implementado para facilitar a análise e seleção de candidatos. As consultas no banco de dados produzem saída compatível com ferramentas de visualização de dados genômicos existentes, tal como o *UCSC Genome Browser*.

6.10 Metabolômica, lipidômica e proteômica

O preparo das amostras e as análises por espectrometria de massa estão sendo realizados em colaboração com a equipe do **Prof. Dr. Carlos Alberto Labate** (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”,

Departamento de Genética, Laboratório Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia da Universidade de São Paulo).

Espectrometria de massa é um método para identificar os diferentes átomos que compõem uma substância. O aparelho bombardeia moléculas com um feixe de íons ou elétrons de alta energia para extrair íons de uma amostra. Nos espectrômetros por setor magnético, os íons atravessam um campo magnético que curva suas trajetórias em linhas diferentes, dependendo de sua carga-massa. A massa e carga dos íons podem ser medidas por sua posição no espectro. A espectrometria de massa tem proporcionado grandes progressos nas áreas de metabolômica (270-272), lipidômica (273-275) e proteômica (276-279).

6.11 Polimorfismos genéticos

Estamos utilizando DNA obtido de pacientes sépticos para estudar polimorfismos genéticos do sistema leucocitário humano (HLA) e dos receptores CD16 e CD32, na tentativa de encontrar algum polimorfismo que seja mais comum ou mais raro nesta população. Tais polimorfismos podem servir como futuros biomarcadores e auxiliar, também, na compreensão das bases moleculares desta doença.

Para a pesquisa de polimorfismos em receptores Fc, estabelecemos colaboração com os **Drs. Luiz Fernando Job Jobim, Mariana Sampaio Leite Jobim e Úrsula da Silveira Matte** (Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul) e com a **Dra. Clarice Sampaio Alho** (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul). Estamos utilizando neste

estudo, excepcionalmente, amostras de pacientes provenientes da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul (PUCRS).

As amostras sanguíneas dos pacientes são coletadas em tubos de 10ml. É realizada a separação celular, por meio do método de Ficoll, e o plasma e as diferentes populações celulares são armazenados para futura análise.

Amostras de sangue periférico são coletadas de cada indivíduo, por punção venosa, em tubos *vacutainer* contendo EDTA como anticoagulante. Essas amostras são centrifugadas para obtenção da camada de leucócitos, a partir da qual o DNA é extraído, usando-se o método de *Salting-out* (280).

Em seguida, o DNA extraído é diluído em água para uma concentração final de 5ng/μl, sendo usados 2,25 μl por reação. Os testes de mutação são realizados com TaqMan (Invitrogen), Ensaios Genotípicos SNP C-258156666_10 para detecção do polimorfismo rs 396991 (FcγRIIIa - CD16a) e C_9077561_20 para detecção do polimorfismo rs 1801274 (FcγRIIa - CD32a). O total de 2,25 μl de DNA genômico é misturado com 2,5 μl de *TaqMan Universal Master Mix* e 0,25 do *TaqMan SNP Genotyping Assay Mix*.

Depois da desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, a amplificação é realizada por 40 ciclos de desnaturação (92°C por 15 segundos), anelamento a 60°C por 1 minuto, e extensão 60°C por 1 minuto. O PCR é realizado no aparelho RT-PCR StepOne Plus (Invitrogen) (281).

Para a investigação dos polimorfismos no sistema leucocitário humano (HLA), estabelecemos colaboração com **Hélcio Rodrigues**, biologista e chefe do Laboratório de Histocompatibilidade do Instituto do Coração do Hospital

das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Neste caso, usamos kits de Miliplex® para a genotipagem.

6.12 Análise Estatística

Uma análise descritiva da população é realizada, dependendo do sub-projeto em questão (282, 283). Variáveis contínuas foram analisadas com teste t de Student ou análise de variância (ANOVA), conforme apropriado. Análise *post hoc* foi realizada com o teste LSD. Variáveis categóricas foram analisadas com teste de qui-quadrado. Testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados, quando necessário, na dependência do padrão de normalidade da amostra.

É calculado o respectivo intervalo de confiança de 95% e um valor de p bi-caudado de 0,05 é considerado estatisticamente significativo.

A análise estatística está sendo realizada com o auxílio dos programas estatísticos SPSS e R.

Situações particulares serão discutidas ou referenciadas no decorrer do texto.

7 Resultados e Discussão

7.1 Considerações gerais

Um biomarcador é definido com “uma característica que seja objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos, normais ou patológicos, ou respostas farmacológicas à intervenção terapêutica”. Incontáveis potenciais marcadores já foram investigados nos pacientes com sepse, desde produtos bacterianos, até citocinas e proteínas de fase ativa. Nenhum deles, entretanto, mostrou, isoladamente, todas as características desejáveis de um biomarcador de sepse: ser não invasivo, rapidamente disponível, com ensaios confiáveis, capaz de diferenciar sepse de outros estados inflamatórios agudos ou crônicos, refletir as alterações clínicas que ocorrem com o paciente no curso da doença e do tratamento, além de ter sido validado em grandes ensaios clínicos.

Incontáveis potenciais candidatos estiveram, ou estão, sendo investigados com esse fim. Embora a maior parte dos resultados finais desses ensaios clínicos tenha sido frustrante, alguns marcadores ultrapassaram a barreira do ceticismo e, isoladamente, ou em conjunto, mostraram ser capazes de cumprir, pelo menos, algumas das funções esperadas de um marcador. Os mais estudados são a interleucina-6 (IL-6), a proteína C reativa (PCR), a procalcitonina (PCT) e o receptor desencadeador expresso em células mielóides 1 (TREM-1). Até estes marcadores, no entanto, apresentam sérias limitações.

Em resumo, podemos dizer que todos os marcadores amplamente pesquisados até o momento, isoladamente ou em conjunto, não foram adequadamente testados ou possuem falhas que os impedem de serem incorporado **sem restrições** à prática clínica. Isso sugere claramente que existe a necessidade de se procurar novas estratégias na busca de novos marcadores.

Conforme exposto, tem sido infrutífera a procura por marcadores que possibilitem o diagnóstico diferencial do paciente com infecção de pacientes com quadro inflamatório não-infeccioso, que possam mensurar a gravidade, nortear tratamento e prever o prognóstico de doentes sépticos.

A existência de tais marcadores poderia revolucionar a maneira pela qual tratamos a sepse e até a pesquisa na área, pois possibilitaria homogeneidade no diagnóstico, o que facilitaria comparação dos resultados obtidos em diferentes grupos.

Em artigo recente, Wagner et al. (284) propõem que o desenvolvimento de um biomarcador deva passar por alguns pontos, de tal maneira que se adeque ao uso proposto.

A primeira fase seria de exploração, de “geração de hipóteses”, na qual dados provenientes de modelos experimentais ou resultados preliminares em humanos seriam avaliados sobre sua utilidade como marcadores. Na segunda fase, ou fase de “tomada de decisões”, esses prováveis marcadores seriam avaliados quanto à sua especificidade e sensibilidade para dar suporte a decisões clínicas. A partir daí seguiriam

estudos prospectivos nos quais esses marcadores seriam testados em situações clínicas, em amostras maiores, para validação e posterior registro.

Ao iniciar este projeto, acreditávamos que a maioria das respostas às perguntas formuladas pelos médicos e pesquisadores da área, só poderiam ser respondidas por meio de uma análise temporal do paciente séptico. E era exatamente essa a grande fortaleza de nosso projeto. Nós nos propusemos a analisar a evolução de pacientes que entravam nas UTIs sem diagnóstico de infecção, com ou sem resposta inflamatória sistêmica. O seguimento desses pacientes nos proveu com informações importantes e inéditas sobre a história natural da sepse em humanos. Entretanto, devido às dificuldades encontradas no dia-a-dia para obtenção de amostras, assim como à dificuldade de se trabalhar de maneira bem controlada, decidimos ampliar nosso campo de ação, voltando a utilizar modelos experimentais de sepse nesta jornada. Assim, se inicialmente trabalhamos apenas com modelos experimentais e, posteriormente, somente com material humano, parece-nos que agora está suficientemente claro que teremos que utilizar ambas estratégias, haja visto que ambos são capazes de gerar grande quantidade de informação e se completam.

O nosso grupo tem analisado múltiplos aspectos do material obtido nas nossas UTIs, partindo das variáveis clínicas mais simples (como frequência cardíaca), passando para a análise clínica (por exemplo, avaliando-se lactato ou excesso de base), celular (número e função de leucócitos, por exemplo) até molecular (com o a expressão de RNAm e proteínas envolvidas na sinalização celular da resposta imune). Assim, o

material coletado pelo nosso grupo está sendo utilizado em múltiplos sub-projetos.

Acreditamos que o atual projeto, com essa dimensão inédita, está sendo extremamente importante, tanto do ponto de vista da descrição da fisiopatologia da doença, com suas características genéticas, celulares e moleculares, quanto do ponto de vista clínico e tecnológico, com a descrição de marcadores que possam ser utilizados na prática clínica.

7.2 Peptídeos Antimicrobianos

Iniciei esta fase do projeto, confirmando em humanos os experimentos de translocação nuclear de catelicidinas em sepse que havia realizado em camundongos, durante meu Pós-Doutorado. Para tal fim, utilizei neutrófilos de pacientes sépticos e microscopia eletrônica (285) **(ANEXO B)**.

Existem evidências crescentes de modos alternativos de ação dos peptídeos antimicrobianos, conforme já demonstrado para a apidaecidina (286), a dermicidina (287), a histatina-5 (288) e defensinas humanas (289).

Além de atração eletrostática, componentes específicos da membrana celular interagem com os peptídeos antimicrobianos. Lipídeo II, por exemplo, é um local de ancoragem da nisina, facilitando a aproximação deste peptídeo na membrana bacteriana (290). Mersacidina também se liga ao lipídeo II, inibindo crescimento bacteriano sem permeabilizar a célula (291). Em diversas situações, a interação inicial parece depender de complexos glicídicos na superfície da membrana (292). Derivados da fosfomanose

aumentam a toxicidade da osmotina, provavelmente por servir como estrutura de ancoragem que facilita a interação e difusão do peptídeo pela parede celular (293).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos se liga *in vitro* a ácidos nucleicos (DNA e RNA) (294-296), indicando que eles podem estar envolvidos em mecanismos de inibição da síntese de DNA, transcrição gênica ou tradução de RNA. Interessante, proteínas de *S. cerevisiae* envolvidas em reparo de DNA foram purificadas em associação com dermaseptina S3 (297). A defensina PSD1, ademais, foi demonstrada dentro do núcleo do fungo *Neurospora crassa*, onde ela deve interferir com o ciclo celular deste organismo (298).

No momento, estamos validando este resultado em células tumorais humanas. Tais experimentos estão sendo realizados em linhagens tumorais de mama, ovário, cólon, pâncreas e melanoma por **Guilherme Tude**, meu aluno de Doutorado. Caso fique confirmado que catelicidinas também translocam para o núcleo celular durante transformação maligna, partiremos para os experimentos de imunoprecipitação de cromatina. Além disso, estamos silenciando LL-37 nestas células tumorais, por uso de RNA de interferência, e iremos fazer ampla pesquisa da expressão de genes de interesse nestas células, em comparação a células não-silenciadas. Para tal objetivo, iremos utilizar kits de PCR array (*RT2 Profiler PCR Array Human Antibacterial Response*, Qiagen), segundo as especificações do fabricante.

A associação entre vitamina D, câncer e AMPs ainda se encontra mal compreendida. Na verdade, a vitamina D e as catelicidinas mostram efeitos

discrepantes em câncer. A superexpressão de LL-37 em células de câncer de mama promove o desenvolvimento de metástases em camundongos SCID(299). LL-37 promove o crescimento mais rápido de câncer de pulmão (140). Por outro lado, LL-37 é expresso em níveis muito baixos em tumores gástricos hiperplásicos, adenomas tubulares e adenocarcinomas (141) e regula negativamente o crescimento do câncer gástrico. Curiosamente, apesar das catelicidinas serem indutores de vitamina D, um número de estudos sugere que a vitamina D pode ser associada a um menor risco de câncer de mama (142) e pulmão (143), mas não de câncer gástrico (144). Vitamina D e LL-37, portanto, exercem efeitos antagônicos em determinadas linhagens tumorais. Este paradoxo sugere que os efeitos de LL-37 na biologia do câncer pode ser vitamina D-independente, ou seja, devido à sua ativação por outros receptores, tais como TLR4 e TLR2, ou outros mecanismos ainda obscuros.

LL-37 está diretamente envolvida no recrutamento de células mesenquimais (MSCs) e aumenta a liberação de imunomoduladores e moléculas pró-angiogênicas, tais como IL-6, IL-10, MMP-2 e VEGF, a partir de MSCs.

Peptídeos antimicrobianos têm sido propostos como novos agentes terapêuticos para o tratamento do câncer, devido aos seus efeitos citotóxicos, bem como por suas funções imunomoduladores, incluindo os seus efeitos em diferenciação celular, angiogênese, proliferação celular e inflamação (146, 147).

Inicialmente, foi proposto que os AMPs apresentariam atividade seletiva para membranas microbianas. Vários estudos, no entanto, têm mostrado efeitos citotóxicos em diversos tipos celulares, tais como em linfócitos T, por exemplo (148, 300).

Camundongos “*knockout*” para catelicidina desenvolveram crescimento tumoral mais rápido do que camundongos selvagens em dois diferentes modelos de implante tumoral (149).

Tanto catelicidinas, quanto a vitamina D e o seu receptor nuclear (VDR) têm demonstrado um papel importante, ademais, na fisiopatologia de outras doenças complexas, principalmente em doenças auto-imunes (301-303) e em AIDS (304-310). No presente momento, estamos resolvendo os trâmites burocráticos para importação de camundongos deficientes em CRAMP, no intuito de realizar experimentos *in vitro* e *in vivo* com estes animais no Brasil.

Ainda no que se refere aos peptídeos antimicrobianos, estudamos a expressão gênica de LL-37 nos neutrófilos de pacientes sépticos da nossa UTI e, para nossa surpresa, descobrimos que a expressão gênica deste peptídeo está diminuída durante choque séptico (**ANEXO C**). LL-37 é secretado constitutivamente na corrente sanguínea, provavelmente para disparar um sinal de alerta, na presença de perigo, pela ativação de receptores *Toll-like* (311). LL-37 apresenta atividade antimicrobiana contra germes gram-positivos e gram-negativos (312) e sua produção aumenta, em decorrência de estímulo inflamatório ou infeccioso (313). As catelicidinas apresentaram um efeito protetor em um modelo de sepse animal (314),

porém os autores não utilizaram bactérias vivas e resultados discrepantes entre modelos animais e experimentos em humanos são frequentes na literatura. Utilizando um modelo de endotoxemia, não encontramos nenhuma diferença de mortalidade ao comparar animais selvagens com animais deficientes em CRAMP (77).

Existem relatos de que LL-37 induz ativação de MAP-quinases em monócitos humanos (108), mas também existem autores que descrevem inibição desta via e da secreção de citocinas pela mesma catelicidina (315, 316). Estes efeitos antagônicos devem ser devido à citotoxicidade das catelicidinas. Acredito que experimentos *in vitro* com peptídeos antimicrobianos exógenos não reproduzem fidedignamente os efeitos fisiológicos destas substâncias, ideia que defendo há vários anos (77).

Recentemente, começou a ser demonstrado que a ligação a um receptor de membrana não é fenômeno indispensável para que um ligante proveniente do meio externo desencadeie sinalização intracelular (317). A formação de poros na membrana celular eucariótica pelos peptídeos antimicrobianos (318) e a indução de fluxos iônicos, provavelmente potencializa a ativação de TLRs e subsequente fosforilação de p38 e IKB α (116). A diminuição na expressão gênica de LL-37, durante choque séptico, é um fenômeno inesperado. Na minha opinião, tal resultado indica que as bactérias estão manipulando vias produtoras de catelicidinas ou que a produção de catelicidinas se tornou “tolerante”, após ativação maciça.

Considerando-se que a produção endógena de catelicidinas estimula sinalização por catelicidinas estimula a ativação de NF- κ B e p38 MAPK, deflagrando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, LL-37 deve agravar ainda mais a tempestade inflamatória característica desta doença. Portanto, nossa hipótese é a de que a inibição da produção de catelicidinas em sepse é um mecanismo protetor para evitar dano inflamatório ainda mais grave.

A diminuição dos níveis de LL-37 na vigência de um choque séptico, ademais, não está correlacionada com os níveis de vitamina D encontrados nestes pacientes. Como os neutrófilos não produzem vitamina D, tais células dependem dos níveis sistêmicos desta vitamina para ativar o VDR. Nossos resultados colocam em evidência que hipovitaminose D, apesar de ubíqua nos nossos pacientes, não é a responsável pela queda na produção de LL-37 durante choque séptico, já que a expressão gênica deste peptídeo antimicrobiano volta a ser estimulada na fase de recuperação da doença. Acreditamos, ainda, que este aumento na produção de LL-37 na fase de resolução de um choque séptico deve ter um papel importante em mecanismos de reparo tecidual (124, 319).

Sepse permanece a principal causa de morte em pacientes críticos. Apesar dos esforços sustentados, a mortalidade permanece inalterada. Manipulação do sistema imune é um tema que atrai os especialistas da área, já que a rapidez com que as bactérias desenvolvem mecanismos de resistência a antibióticos e os riscos de infecção secundária a métodos de tratamento invasivos, tais como plasmaférese, ventilação mecânica e terapia dialítica, nos fazem buscar alternativas mais eficazes.

Peptídeos antimicrobianos são excelentes candidatos, já que além de apresentarem atividade microbicida, também são capazes de coordenar a resposta imune de maneira ampla e complexa (320). A administração de catelicidinas tem sido sugerida como uma potencial terapia para a sepse, devido às suas propriedades antimicrobianas e neutralizadoras de LPS (320). Em nossa opinião, entretanto, peptídeos antimicrobianos exacerbam a resposta inflamatória e são deletérios em sepse e em outras síndromes inflamatórias sistêmicas, tais como pancreatite aguda, choque hemorrágico, trauma grave, grandes cirurgias e em grandes queimados.

7.3 Receptores Fc de Imunoglobulinas

Em função do conhecimento obscuro da fisiopatologia da sepse e da escassez de terapias eficazes, a identificação de proteínas envolvidas na interação de *E. coli* e CD16 tem excelente potencial para o tratamento de pacientes sépticos, dado o fato que a ligação entre CD16 e *E. coli* previne a fagocitose e promove inflamação, efeito que pode ser bloqueado para induzir aumento da fagocitose e diminuição da resposta inflamatória sistêmica, um dos objetivos mais ambiciosos do presente trabalho (**Figura 12**).

Figura 12 – Mecanismo desenvolvido por *E. coli* para evadir de fagocitose mediada pelo CD16 e seu bloqueio farmacológico como uma nova perspectiva terapêutica em sepsse

O papel das respostas efetoras dos receptores Fc foi, durante décadas, atribuído a uma balança de ativação e inibição, que se manifesta como uma resultante do espectro que impera. Enquanto a resposta ativatória depende de receptores com motivos ITAM, a resposta inibitória se caracteriza pela via co-agregação de receptores ativatórios com receptores inibitórios ou pela co-agregação de receptores inibitórios, portadores de motivos ITIM.

Este conceito clássico, entretanto, já pode ser considerado incompleto, pelo fato de que publicações crescentes na literatura têm

demonstrado que os motivos ITAM também são capazes de desencadear respostas inibitórias.

O papel inibitório da cadeia gama em sepse abre novas perspectivas para o tratamento de doenças infecciosas. Impõe-se, neste momento, a rediscussão dos conceitos clássicos de ITIM e ITAM, já que a capacidade inibitória deste último não condiz com a definição clássica e ainda vigente nos Tratados de Imunologia.

Minha aluna de Doutorado **Jaqueline Beppler** já conseguiu finalizar os experimentos de *phage display* e identificou dois potenciais candidatos que se ligam fortemente ao CD16 e podem induzir sinalização inibitória por este receptor. Tais peptídeos são: **YWGGTEGA** e **FGAHGVFF**.

Conseguimos, pela CAPES, bolsa de Doutorado-sanduiche para tal aluna passar o segundo semestre de 2014 na França, no laboratório do **Prof. Renato Costa Monteiro**, a fim de realizar experimentos *in vitro* e *in vivo* com tais peptídeos e, assim, validar sua função esperada.

Jaqueline Beppler está realizando estes experimentos agora na França, com o uso de modelos celulares já bem padronizados no Laboratório do **Prof. Dr. Renato Costa Monteiro** (Faculté Xavier Bichat, Paris). Tais experimentos incluem experimentos com linhagens celulares transfectadas com diversos receptores Fc de imunoglobulinas, assim como experimentos *in vivo*, utilizando modelo animal de sepse.

Estamos, além disso, importando camundongos deficientes em CD16, no intuito de realizar experimentos *in vitro* e *in vivo* com estes animais no Brasil.

Pasquier et al. (212) foram pioneiros em mostrar que monômeros de IgA induzem sinalização celular ITAM-inibitória, pelo receptor CD89 (Fc α RI). A sinalização ITAM inibitória (denominada ITAMi) é caracterizada pelo recrutamento transitório da quinase Syk, seguida do recrutamento estável de uma tirosina fosfatase, SHP-1, o que resulta na inibição de múltiplos receptores heterólogos, pela formação de estruturas chamadas “inibissomos” (321). Por outro lado, a ligação de polímeros de IgA ou seus complexos induzem a um recrutamento estável de Syk, induzindo ativação celular (161).

Além das análises realizadas por softwares como BLASTp e ClustalW, uma análise mais avançada por bioinformática está sendo realizada, graças a uma parceria com o **Prof. Dr. Paulo Sérgio Lopes de Oliveira** (Laboratório Nacional de Biociências, Campinas, São Paulo). Parte deste trabalho inclui a criação de um banco de peptídeos de superfície com mais de 3000 estruturas de *E. coli*.

7.4 Sepses no idoso

Doenças associadas ao envelhecimento são a principal causa de morte no mundo. O envelhecimento pode ser entendido como a consequência da passagem do tempo ou como o processo cronológico pelo qual um indivíduo se torna mais velho. Esta tradicional definição tem sido desafiada pela sua simplicidade.

Em biologia, “senescência” é o processo natural de envelhecimento ou o conjunto de fenômenos associados a este processo. Este conceito se opõe à senilidade, também denominada envelhecimento patológico, e que é entendida como os danos à saúde associados com o tempo, porém causados por doenças ou maus hábitos de saúde.

“Envelhecimento ou senescência celular” é o fenômeno em que células isoladas demonstram uma habilidade limitada de se dividirem em um meio de cultura, bem como as alterações bioquímicas – elucidadas ou não – associadas a esta limitação.

“Senescência orgânica” é o envelhecimento do organismo como um todo, ligado, entre outros fenômenos, ao envelhecimento celular. O envelhecimento do organismo é geralmente caracterizado pela diminuição da capacidade de responder a desafios da função orgânica. Estes desafios em geral oneram a capacidade funcional de nossos órgãos e sistemas, que diminui com o passar dos anos. De forma interessante, em indivíduos jovens e saudáveis, esta capacidade funcional se encontra muito além do necessário para o cotidiano, de forma que existe uma denominada reserva funcional. O envelhecimento fisiológico ou normal pode também ser entendido como uma diminuição progressiva desta reserva funcional, de forma a diminuir a capacidade de resposta a desafios. Esta diminuição na capacidade de manter a homeostase do organismo tem sido denominada homeostenose e está ligada a riscos progressivamente maiores de doença ou perda da capacidade funcional. Por esta razão, a morte é a consequência

final do envelhecimento, mas vale notar que a diminuição das reservas funcionais em seres humanos é lenta e progressiva, sendo compatíveis com vida saudável em idades tão avançadas como a dos centenários. É o stress adicional das doenças (especialmente as doenças crônicas) e dos maus hábitos de vida (como tabagismo, alcoolismo, sedentarismo, obesidade e outros), o grande vilão para a saúde do idoso.

Alguns pesquisadores trataram no passado o envelhecimento como mais uma doença. No entanto, esta visão está cada vez menos arraigada nos meios científicos, à medida que a presença deste fenômeno se demonstra em praticamente todos os seres vivos.

É de conhecimento geral, o aumento da idade média da população e dos doentes submetidos a procedimentos cada vez mais complexos. O conhecimento dos mecanismos envolvidos no envelhecimento e, principalmente, particularidades das respostas inflamatórias locais e sistêmicas destes indivíduos, pode reduzir a mortalidade e a morbidade desta população.

Apesar dos dados experimentais demonstrando resposta inflamatória exacerbada em animais idosos após estímulo infeccioso, a hipótese prevalente é a de que pacientes idosos são imunodeprimidos, quando comparados a indivíduos jovens.

O processo de envelhecimento tem sido bastante estudado pela comunidade científica, já que está estreitamente relacionado com doenças como aterosclerose, doença de Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2 e outras

das principais causas de óbito no mundo inteiro. A senilidade é associada a níveis cronicamente elevados de marcadores inflamatórios, tais como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 e proteína C-reativa (322) e a senescência parece influenciar diversos componentes do sistema imune. Alterações profundas na função de células T foram descritas em idosos (323, 324), especialmente naquilo que se refere à atividade de células Th17 e T regulatórias (323, 325). Em relação à imunidade inata, alterações ocasionadas pela idade têm sido descritas em macrófagos, células polimorfonucleares e NK (326, 327). Resultados discrepantes, entretanto, são observados com frequência (328). Enquanto alguns autores detectam uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias em pacientes idosos sob stress agudo, quando comparados a pacientes jovens (329), outros tem descrito resultados opostos (330).

Sepse é uma doença de pessoas idosas. Com efeito, 60% dos casos de seps e 80% dos óbitos relacionados a esta doença, ocorrem em indivíduos com mais de 65 anos de idade (331). A incidência aumenta exponencialmente com a idade e idade avançada é um fator de risco independente para mortalidade em adultos hospitalizados por seps e (332). Um estudo de coorte recente de pacientes hospitalizados com seps e induzida por pneumonia, encontrou um aumento relacionado com a idade na mortalidade intra-hospitalar, 90 dias e um ano após a alta (333).

A razão para uma maior mortalidade por infecção e maior risco de seps e severa em indivíduos idosos, entretanto, permanece obscura (3). Idade avançada tem sido largamente caracterizada como um estado pró-inflamatório (334), porém pouco se sabe sobre a resposta imuno-inflamatória

do idoso mediante um insulto agudo. Modelos experimentais de infecção suportam que animais mais velhos apresentam níveis mais elevados de marcadores inflamatórios, porém tais estudos permanecem inconclusivos, por não encontrarem reprodutibilidade em humanos.

Tateda et al. demonstraram que animais idosos exibem níveis mais elevados de TNF α , IL-1 β e IL-6 do que camundongos jovens, após injeção intraperitoneal de LPS (335). Usando o modelo de ligadura e punção cecal (CLP), Turnbull et al. também relataram resultados semelhantes (336). O mecanismo subjacente para a maior vulnerabilidade do idoso à infecção tem sido atribuído a uma possível maior fragilidade das barreiras anatômicas, a doenças co-existent ou a uma menor eficiência do sistema imune (337), enquanto que infecções latentes, tais como citomegalovírus (CMV) podem agir como estímulo crônico ao sistema inflamatório, levando a uma resposta imune ineficaz em situações agudas (338, 339). Inflamação persistente tem sido associada a um maior risco de invasão bacteriana, por reduzir o recrutamento de neutrófilos e o “clearance” bacteriano (340, 341). Turnbull et al. propuseram que macrófagos de camundongos idosos estão parcialmente ativados, ou “primed”, para a produção de citocinas. Relatos conflitantes, entretanto, são observados quando a produção *in vitro* de citocinas por células idosas é investigada (342-345). Um estudo clínico recente, ademais, foi incapaz de encontrar qualquer diferença relacionada à idade no perfil inflamatório de pacientes internados por pneumonia (333). De maneira similar, Kelly et al. não encontraram diferenças no perfil de citocinas de pacientes jovens, idosos e muito idosos com pneumonia adquirida na

comunidade (346). Em um estudo realizado pelo nosso grupo, também fomos incapazes de encontrar qualquer citocina, quimiocina ou fator de crescimento que possa servir para melhor explicar o motivo pelo qual esta população apresenta maior susceptibilidade e mortalidade por choque séptico (347) (**ANEXO D**). Nós sugerimos, portanto, que a maior mortalidade hospitalar do idoso, provavelmente, é devido à disfunção de células não-imunes. Quebra de barreiras epiteliais, mal funcionamento de células ciliares, má absorção de nutrientes, desnutrição, déficits de cognição e comorbidades, na nossa opinião, apresentam um papel-chave.

Defeitos de fagocitose, produção de espécies reativas do oxigênio, produção de imunoglobulinas e outras funções celulares deveriam ser melhor caracterizadas *in vivo*, porque permanecem pouco estudados até o presente momento.

Com o objetivo de avançarmos neste sentido e abrirmos novas portas para a compreensão das particularidades da resposta inflamatória sistêmica do doente idoso, temos três sub-projetos em andamento.

O primeiro deles utiliza mRNA de neutrófilos de pacientes jovens e idosos em choque séptico, obtido nas nossas UTIs. Com este material, realizamos DNA microarray, com o intuito de rastrear todo o transcriptoma destes indivíduos. Estamos pesquisando, inclusive, os microRNAs (348, 349) e outros RNA não-codificadores. Diversas análises de transcriptômica têm revelado a presença de RNAs não codificadores (ncRNAs) que podem ser divididos em função de seu tamanho em longos (> 200 nucleotídeos) ou

curtos (até 200 nt) e que agem de forma regulatória na expressão gênica (350). Algumas classes de RNAs não-codificadores, como os microRNAs, têm sido amplamente estudadas. RNAs não-codificadores longos (lncRNAs), entretanto, foram menos explorados, apesar de já ser inquestionável que eles afetam o comportamento da célula, controlando processos biológicos essenciais como diferenciação e ciclo celular (351). Segundo pesquisa que realizamos no PubMed, nosso trabalho é inédito, não existindo até o presente momento relatos sobre a expressão de lncRNAs e microRNAs no sistema imunológico humano de pacientes idosos em sepse.

Os experimentos foram conduzidos pela **Dra. Patricia Severino** (Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein, São Paulo) e estão sendo analisados pelo **Prof. Dr. Eduardo Moraes Rego Reis** (Instituto de Química da Universidade de São Paulo) e por **Diogo Vieira da Silva Pellegrina**, aluno de Mestrado do Programa de Bioinformática do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, de quem sou co-orientador.

O segundo projeto se encontra em fase menos avançada e tem como objetivo a realização de experimento de DNA microarray em amostras de tecido cerebral (córtex, hipocampo e cerebelo) de ratos jovens e idosos, submetidos a modelo de ligadura e punção cecal. Como será aprofundado no **item 7.6**, acometimento cerebral é manifestação comum e precoce no desenvolvimento da sepse. Os experimentos deste sub-projeto estão sendo realizados por meu aluno de Doutorado, **Mike Yoshio Hamasaki**.

O terceiro deles investiga o papel dos peptídeos antimicrobianos na resposta inflamatória local e sistêmica de ratos submetidos a um modelo de pancreatite aguda. Tal projeto deu origem à Dissertação de Mestrado de minha aluna **Débora Maria Gomes Cunha** e foi submetido recentemente à revista *Experimental Gerontology* (**ANEXO E**).

A integridade da barreira intestinal é de suma importância. Doenças que alteram a permeabilidade intestinal, tais como sepse e pancreatite aguda, são associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade. Pancreatite aguda é uma doença frequente em UTIs, sendo uma das principais causas de SIRS de origem não-infecciosa. As principais causas para esta doença são o alcoolismo ou a obstrução do ducto pancreático por cálculos (352). O prognóstico da pancreatite aguda está diretamente relacionado à intensidade do processo inflamatório. Níveis sistêmicos elevados de IL-6 e TNF α estão associados a uma alta mortalidade. Na tentativa de evitar dano tecidual excessivo, o organismo deflagra uma resposta contra-regulatória concomitante, caracterizada pela secreção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 (353-356). Decidimos, portanto, investigar a produção de peptídeos antimicrobianos, componentes chave da imunidade inata, em ratos jovens e idosos, submetidos à injúria pancreática química aguda.

Pancreatite aguda severa é caracterizada por necrose pancreática e peripancreática com complicações sistêmicas que, com frequência, causam falência de múltiplos órgãos. Por razões obscuras, a doença costuma causar maior mortalidade no paciente idoso, do que no indivíduo jovem (357).

A barreira intestinal tem um papel central na pancreatite aguda (358), já que permeabilidade intestinal aumentada pode proporcionar translocação bacteriana e exacerbação da resposta inflamatória (359, 360). Os peptídeos antimicrobianos produzidos pelo epitélio intestinal devem auxiliar na manutenção da integridade da mucosa (361).

No nosso estudo, detectamos um aumento significativo na expressão gênica das α -defensinas 5 e 7 e da citocina TNF α no íleo terminal de ratos idosos, em comparação a animais jovens, na vigência de insulto pancreático. Tal aumento nos níveis de TNF α em decorrência da idade dos animais ocorreu no íleo terminal, porém nenhuma diferença foi detectada nos valores plasmáticos desta citocina, demonstrando que a diferença de resposta inflamatória entre ratos jovens e idosos com lesão pancreática aguda, ocorre de maneira localizada, e não de maneira sistêmica. Nós propomos, portanto, que ratos idosos devem ter ruptura da integridade intestinal, sofrendo translocação bacteriana aumentada, na vigência de pancreatite aguda. Tal evento deve deflagrar produção maciça localizada de peptídeos antimicrobianos e citocinas pró-inflamatórias. Nós acreditamos que a produção de peptídeos antimicrobianos aumentada no idoso deve agravar ainda mais o processo inflamatório, já que tais moléculas participam de diversas vias de sinalização do sistema imuno-inflamatório, criando, assim, um ciclo vicioso deletério. Apesar dos peptídeos antimicrobianos serem potentes alarminas, eles devem agravar a injúria local.

7.5 Sepses no doente nefropata

Com o envelhecimento da população, um maior número de pacientes são admitidos nos hospitais com doenças crônicas. Em tais indivíduos, a incidência de infecções nosocomiais e de comunidade estão aumentadas (362). Os pacientes com doença renal crônica representam um grupo importante, porque eles apresentam co-morbidades significativas e incidência aumentada de sepse, em comparação a indivíduos com função renal normal (363). Com efeito, sepse é a causa mais frequente de hospitalização nesta população (364).

Nas Unidades de Terapia Intensiva, ademais, diversos pacientes desenvolvem injúria renal aguda por sepse (365), com mortalidade entre 20 e 60% (366). Pacientes com disfunção renal, portanto, são extremamente graves e uma porcentagem significativa dos pacientes em sepse.

Tem sido bastante debatido por especialistas no assunto, a influência de fatores como uremia (367-369), balance eletrolítico, distúrbios ácido-base, dentre outros, na resposta imune do paciente em choque séptico. Vários fatores, tais como uremia, defeitos de opsonização e deficiências de vitaminas e elementos-traço têm sido associadas a uma maior incidência de sepse em doentes com doença renal em estágio terminal (364). Apesar disso, as peculiaridades moleculares que levam disfunção renal a interferir em aspectos do sistema imune e do processo inflamatório na vigência de sepse permanecem pouco caracterizadas.

Os rins são responsáveis por absorção de cálcio e fosfato, excreção de magnésio e hidroxilação da vitamina D à sua forma ativa, resultando em

absorção de cálcio pelo trato gastrointestinal. O hormônio paratireoideano (PTH), entretanto, é o mais importante e sensível regulador dos níveis de cálcio, orquestrando sua absorção renal e a mobilização óssea (370), no intuito de manter as concentrações séricas rigidamente controladas.

Apesar de algumas publicações terem investigado os efeitos do cálcio (371), da vitamina D (372) e do PTH em doenças críticas (371), a maioria dos estudos foram feitos em animais (373-375), usando modelos de sepse que não refletem a complexidade da doença (376, 377). Um estudo avaliando todos estes aspectos em pacientes sépticos e não-sépticos estava faltando. Tal estudo foi realizado pelo nosso grupo, como parte deste projeto, e publicado em 2013 (**ANEXO F**). Já se sabia que hipocalcemia é um distúrbio metabólico frequente em pacientes graves (378). Secreção aumentada de PTH na vigência de sepse, assim, é um fenômeno esperado. Para nossa surpresa, no entanto, detectamos que pacientes com acometimento renal apresentam queda abrupta da secreção de PTH, na fase de resolução da sepse, fato que não ocorreu em indivíduos com função renal normal.

Em nosso estudo, hipocalcemia foi detectada em todos os grupos estudados independentemente da função renal do doente. Nossos resultados, portanto, sugerem que apesar do fato dos rins serem reguladores essenciais na homeostasia do cálcio, outros mecanismos também devem estar implicados. Como os efeitos da inflamação sistêmica na função renal do doente são pouco compreendidos, não se pode excluir a presença de disfunção renal, mesmo na presença de níveis normais de

creatinina sérica, já que acometimento tubular parece ser um aspecto da lesão renal relacionada à sepse (379).

Hipocalcemia é considerada um marcador de severidade da doença, e não uma causa de mortalidade elevada (380). Com efeito, um estudo recente mostrou que somente anormalidades extremas nas concentrações de cálcio iônico são preditores independentes de mortalidade (381) e uma revisão sistêmica sobre o assunto concluiu que não existem evidências que suportem o controle rígido dos níveis de cálcio para se melhorar o desfecho de doentes críticos (382). A *Surviving Sepsis Campaign*, inclusive, não recomenda administração rotineira de cálcio em seus *guidelines* (383).

O cálcio apresenta uma miríade de funções celulares, incluindo efeitos na secreção de hormônios, na atividade de enzimas, na condução nervosa, na contração muscular e na mineralização óssea. Na realidade, as células investem bastante energia para manter baixos níveis intracelulares de cálcio. Influxo de cálcio é um potente ativador celular e, junto com o fosfato, altera campos magnéticos e a conformação de proteínas, ditando boa parte da sinalização celular (384). Insuficiência renal crônica, provavelmente, leva a um estado de toxicidade por cálcio (385), ocasionado pelas suas elevadas concentrações intracelulares. Tem sido proposto que o mecanismo responsável seria um influxo celular aumentado de cálcio, mediado pelo PTH, e um déficit na saída de cálcio da célula (386-389). Os efeitos do PTH no sistema imune, entretanto, são obscuros. Receptores de PTH foram identificados em células mononucleares humanas (390) e em

linfócitos (391) e devem elevar os níveis intracelulares de cálcio, levando a um aumento nos níveis de adenil ciclase e outros efeitos inesperados.

Fisiologicamente, durante hipocalcemia abrupta e prolongada, as concentrações plasmáticas de PTH atingem seu pico em 10 minutos e declinam em aproximadamente 60% deste valor em 60 minutos (392). Alterações nas concentrações extracelulares de cálcio são detectadas pela paratireóide por *calcium-sensing receptors* (CaSRs), ocasionando rápidas alterações na secreção de PTH. CaSRs, além disso, foram descritos nos mais diversos tecidos, tais como na tireóide, rins (393), trato gastrointestinal (394), tecido ósseo (395), cérebro (396) e pele (397). Em um número tão grande de tipos celulares, CaSRs estão relacionados a uma miríade de funções, incluindo secreção, diferenciação, proliferação, apoptose e expressão gênica. CaSRs são expressos na maior parte das porções dos néfrons e foi postulado que teriam um papel específico (398-400).

Insuficiência de vitamina D é comum em pacientes hospitalizados (401) e têm sido associada a um risco aumentado de sepse (402). Apesar de seu papel bem estabelecido na absorção de cálcio e na homeostase óssea, a vitamina D tem sido implicada em mecanismos de proliferação celular (403), câncer (95, 404) e infecção (405). Diversas células imunes, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos expressam o receptor de vitamina D (406), um potente indutor de LL-37 (75, 311, 407, 408). A sua forma ativa, entretanto, possui uma meia-vida de menos de 4 horas. 25-hidroxivitamina D, com uma meia-vida de 2 semanas é rotineiramente usada para se acessar os níveis desta vitamina. Hipovitaminose D foi um achado

ubíquo em nossos pacientes. Interessante, recentemente foi demonstrado que a 1-25-dihidroxitamina D estimula o desenvolvimento de células Foxp3(+) T reguladoras (409). Os efeitos da suplementação rotineira com vitamina D para pacientes críticos permanece em investigação (410-413).

Conexões importantes existem entre as vias do PTH e da vitamina D. PTH estimula hidroxilação da vitamina D, aumentando a liberação de 1-25-dihydroxyvitamina D pelas células renais. Por outro lado, a vitamina D age nas células da paratireóide, inibindo a expressão gênica de PTH. Crescentes evidências, ademais, apontam que a 1-25-dihidroxitamina D regula a expressão de receptores sensores de cálcio (CaSRs) (414).

Hormônio paratireoidiano eleva as concentrações de cálcio extracelular, ao estimular a 1 α -hidroxilase renal a converter 25-hidroxitamina D em 1,25-dihidroxitamina D (calcitriol) e por estímulo à reabsorção óssea e renal de cálcio no néfron distal. PTH eleva indiretamente os níveis séricos de fosfato, ao estimular a ação da vitamina D e pela reabsorção óssea. Estes efeitos são regulados pela inibição da reabsorção renal de fosfato.

Tem sido sugerido que citocinas poderiam desregular a secreção de PTH, durante sepse (371), talvez por indução no aumento da expressão de CaSRs, o que reduziria o "set point" para supressão da secreção de PTH pelo cálcio extracelular, ocasionando, assim, hipocalcemia e hipoparatireoidismo. Com efeito, IL-6 estimula a transcrição gênica de CaSRs (415) e a própria ativação de CaSRs é capaz de induzir produção de TNF α (416). Na fase de recuperação, após choque séptico, nós detectamos

um estado de hipoparatiroidismo “relativo”, caracterizado por uma diminuição significativa dos níveis séricos de PTH, apesar de hipocalcemia persistente. Nós propomos, portanto, que CaSRs são afetados pelos níveis de citocinas pró-inflamatórias e tornam-se desregulados na presença de inflamação sistêmica.

Com efeito, os níveis de PTH não foram suficientes para contrabalançar a hipocalcemia presente nos doentes críticos do nosso estudo. Na fase de recuperação da sepse, os pacientes com disfunção renal apresentaram uma abrupta diminuição dos níveis de PTH, com persistência dos valores diminuídos de cálcio. Nossa hipótese é a de que a função dos CaSRs é repentinamente otimizada, quando a inflamação sistêmica entra em fase de resolução, levando a níveis inapropriadamente baixos de PTH. Esta súbita queda nos níveis séricos de PTH foi observada exclusivamente em pacientes com disfunção renal. Doença renal crônica e terapia dialítica levam a uma disfunção imune adquirida (417) e hiperparatiroidismo secundário tem sido implicado como um fator contribuidor (418).

Acúmulo intracelular de cálcio pode deflagrar injúria, causar arritmias cardíacas e morte celular. Neutrófilos de pacientes com elevados níveis de PTH apresentam defeitos de quimiotaxia, fagocitose e “killing” microbiano (419, 420). PTH também tem sido implicado na função de linfócitos. Alguns autores sugerem que a uremia teria um efeito na proliferação de células T, porém tais publicações são difíceis de se interpretar, já que é extremamente difícil reproduzir *in vitro*, as complexas anormalidades encontradas no paciente urêmico. Apesar disso, a proliferação de linfócitos T parece ser

restaurada em pacientes com disfunção renal crônica submetidos a paratireoidectomia (421). Diversas publicações, além disso, têm demonstrado uma inibição dose-dependente na proliferação de células B e na produção de anticorpos, causada pelo PTH (422).

Dois tipos de compostos farmacológicos agem nos receptores sensores de cálcio (CaSRs): 1) calciomiméticos (423), que aumentam a sensibilidade dos CaSRs ao cálcio extracelular e 2) calciolíticos (424), que agem como antagonistas de CaSRs. Maiores estudos, utilizando modelos apropriados de sepse, precisam ser desenvolvidos para se avaliar o eventual papel destas drogas como novos agentes terapêuticos nesta doença (425).

Nosso estudo foi o primeiro a investigar o papel do PTH e do cálcio em sepse humana, avaliando vários momentos do desenvolvimento da doença. Na realidade, nós conhecemos apenas outros três estudos que investigaram o papel do PTH em sepse. Um deles conclui que valores elevados de PTH são um evento tardio em sepse, associado à insuficiência de múltiplos órgãos (426). Os dois outros são muito similares e descrevem valores altos de PTH em associação à gravidade de pacientes sépticos e em pacientes submetidos a grandes cirurgias (371, 427). Estudos futuros são necessários para se confirmar nossos achados em pacientes sépticos com disfunção renal e esclarecer se uremia e inflamação apresentam efeitos deletérios sinérgicos sobre o eixo do PTH.

Nós detectamos, portanto, que pacientes sépticos com disfunção renal apresentam um aumento significativo dos níveis de PTH na vigência de resposta inflamatória sistêmica, seguido de uma queda abrupta dos níveis

deste hormônio na fase de recuperação da doença, fato que não foi detectado em pacientes com função renal normal. Os níveis séricos de cálcio iônico permanecem baixos na fase de resolução e, portanto, não explicam essa queda abrupta nos níveis de PTH. Sugerimos, portanto, que a secreção de PTH em sepse é desregulada pela resposta inflamatória explosiva e que na fase de recuperação, o PTH se encontra “tolerante” a níveis baixos de cálcio. Nós acreditamos que o PTH tem efeitos deletérios em sepse, induzindo provável sobrecarga intracelular de cálcio. Mais estudos precisam ser desenhados para melhor entendermos se intervenção nas vias sinalizadas por receptores de PTH ou CaSRs afetam a mortalidade de pacientes sépticos, assim como as bases moleculares que ditam os efeitos do PTH e dos receptores sensores de cálcio (CaSRs) sobre o sistema immune na presença de ataque bacteriano severo.

7.6 Encefalopatia séptica

A encefalopatia associada à sepse é uma manifestação precoce e comum desta doença. Seu diagnóstico clínico, entretanto, não é fácil. Pacientes críticos necessitam, frequentemente, de sedação e ventilação mecânica, fatores que dificultam o diagnóstico de *delirium*. Publicações recentes demonstram que a sepse pode se manifestar com distúrbios precoces de cognição e memória que se assemelham à demência (428) e pacientes que sobrevivem à sepse podem apresentar sequelas crônicas nas esferas física, cognitiva e emocional (429-431).

A identificação destes pacientes, portanto, é imprescindível e a busca de marcadores de acometimento cerebral é importante objetivo de pesquisa médica.

A quebra da barreira hemato-encefálica, durante um processo infeccioso, altera a interação do cérebro com o sistema imune, iniciando, assim, a gênese de uma série de sinais e sintomas observados nestes indivíduos.

Observações científicas têm deixado claro que sepse leva à inflamação cerebral de grande magnitude e apoptose de neurônios, cujo significado clínico permanece indefinido. Dano do sistema nervoso autonômico, assim como desregulação do sistema neuro-endócrino, ademais, parecem, igualmente, participar da gama de fatores que contribuem para as disfunções orgânicas detectadas nesta doença (432, 433).

Apesar das evidências de dano e disfunção cerebral em sepse, somente nos últimos anos as interações recíprocas entre o sistema imune e o sistema nervoso central começaram a ser apreciadas com maior consideração (434-436).

O cérebro sempre foi considerado um órgão privilegiado, por se encontrar separado do sistema imune pela barreira hemato-encefálica (BHE), pela ausência de drenagem linfática e pela baixa expressão de moléculas de MHC-I em suas células parenquimatosas. Tal característica é importante, já que, devido à amplitude de funções controladas pelo sistema

nervoso, alterações no seu funcionamento podem desencadear repercussões extremamente deletérias e, até mesmo, incompatíveis com a vida. Estando, assim, de certa forma protegido, dentro de um “santuário”, o cérebro permanece resguardado, por exemplo, de inflamação excessiva, assim como de lesão auto-imune (437).

Para melhor compreendermos esta questão, cabe a citação de algumas estruturas cerebrais de capital importância na resposta a uma infecção. Dentre elas, encontram-se: 1) os núcleos autonômicos medulares (núcleo do trato solitário, núcleos motores dorsais do vago e núcleo ambíguo), por controlarem a descarga parassimpatomimética e, indiretamente, a atividade simpática; 2) os núcleos parabraquiais, grupo de células A5 e área postrema, localizados no tronco cerebral e controlando os núcleos medulares autonômicos; 3) os núcleos da rafe (por serem a fonte das fibras serotoninérgicas) e a formação reticular ascendente; 4) o locus ceruleus, localizado tanto na ponte, quanto na rede noradrenérgica; 5) os núcleos paraventriculares hipotalâmico e supra-óptico, por sintetizarem e liberarem fator estimulador de corticotrofina e vasopressina e 6) as amígdalas, localizadas no hipocampo e conectadas ao sistema límbico.

Além de suas funções neuroendócrinas, o fator estimulador de corticotrofina e a vasopressina são também neurotransmissores, com receptores expressos nos núcleos autonômicos medulares e locus ceruleus. Importante enfatizar, ademais, que todas estas estruturas estão interconectadas, particularmente os núcleos paraventriculares, o locus ceruleus e os núcleos do trato solitário, apresentando projeções recíprocas.

As redes do fator estimulador de corticotrofina (FEC), vasopressina e noradrenérgicas são coativadas durante a resposta ao stress e modulam uma a outra. Elas são, também, influenciadas por sistemas facilitadores (serotoninérgico e colinérgico) e inibidores (ácido γ -aminobutírico e opióide), assim como por mecanismos periféricos de “feedback”, tais como mediadores inflamatórios circulantes, baroreflexos aferentes (vasopressina e núcleos autonômicos), níveis plasmáticos de corticóides (ACTH e FEC) e osmolalidade plasmática.

Um nível adicional de complexidade é a organização celular interativa cerebral, que inclui células endoteliais, gliais (astrócitos e micróglia) e neurônios. Tais células desempenham diversas funções na vigência de infecção, tais como produção de óxido nítrico e glutamato. Por outro lado, células como os astrócitos são capazes de transportar substratos energéticos, destruir patógenos, remover debris e promover reparo tecidual (438).

Os estudos neuropatológicos em pacientes sépticos são escassos. Sharshar et al., entretanto, em estudo prospectivo com 23 pacientes que morreram de choque séptico, encontraram hemorragia cerebral em 26% dos casos, síndrome de hipercoagulabilidade em 9%, microabcessos em 9% e leucoencefalopatia multifocal necrotizante em 9% (439).

O sistema imune sinaliza a presença de infecção ao cérebro, por meio: 1) dos órgãos peri-ventriculares, compostos de tecido especializado e localizados em posição estratégica, no meio do sistema ventricular. Como tais órgãos não são protegidos pela BHE, funcionam como via da

comunicação entre o cérebro e a corrente sanguínea; 2) do nervo vago, que detecta inflamação periférica, provavelmente por receptores de citocinas, integrando informação imune à medula; 3) das células endoteliais, que levam à liberação ou difusão passiva de mediadores inflamatórios e neurotóxicos.

Apesar das células endoteliais cerebrais não exprimirem CD14, LPS pode ativar MAP-quinases, por meio do CD14 solúvel. Células endoteliais cerebrais, ativadas por LPS, produzem IL-1 β , TNF α e IL-6, assim como NO sintase (NOS) endotelial e induzível. Tais mediadores interagem com as células circunjacentes, devendo, assim, alterar características da própria BHE.

Diversos outros mecanismos têm sido estudados, na tentativa de melhor se compreender as manifestações neurológicas detectadas em pacientes sépticos. Dentre elas, podem-se citar, o fluxo sanguíneo cerebral, reatividade vascular e consumo de oxigênio (440). Tais estudos, entretanto, não são conclusivos e o tópico permanece sob investigação.

Uma enormidade de outras substâncias estão envolvidas na resposta cerebral à infecção, incluindo-se, dentre elas, quimiocinas, fator inibidor de macrófagos, fator ativador de plaquetas, radicais superóxido e monóxido de carbono.

Óxido nítrico, citocinas e prostaglandinas modulam a neurotransmissão cerebral, especialmente do sistema β -adrenérgico, a produção e liberação de fator liberador de corticotropina, ACTH e vasopressina, assim como as vias eferentes medulares do centro

autônomo. Por outro lado, neurotransmissores e neurohormônios também modulam a expressão cerebral de mediadores inflamatórios. A resposta neuroendócrina e autonômica é extremamente complexa, já que envolve o entrelaçamento de diversas vias e tipos celulares.

Alterações e ativação de diversas vias de sinalização já foram relatadas no funcionamento do cérebro de pacientes sépticos. No entanto, uma compreensão mais clara, no sentido de se integrar estes achados e compreender seu significado molecular de maneira ampla, ainda parece uma realidade bastante distante.

A prevalência de encefalopatia em sepse severa varia de 9 a 71%, dependendo de como for definida e diagnosticada. A gravidade da encefalopatia, ademais, parece se correlacionar positivamente com "scores" de gravidade, tais como o APACHE II, assim como com a mortalidade destes indivíduos.

A fisiopatologia da encefalopatia séptica é multifatorial e inclui, disfunção endotelial cerebral, com quebra da barreira hemato-encefálica e alterações no fluxo sanguíneo cerebral, levando à translocação de moléculas neurotóxicas e isquemia/hipoperfusão cerebral (441, 442). Aminoácidos neurotóxicos, tais como amônia, triptofano, tirosina e fenilalanina, apresentam níveis plasmáticos aumentados, devido à proteólise muscular e "clearance" hepático diminuído. Outras substâncias, capazes de alterar o metabolismo neuronal e glial, incluem as endotoxinas e diversos mediadores inflamatórios. Insuficiência renal e hepática, distúrbios metabólicos e drogas

neurotóxicas completam a multiplicidade de fatores capazes de promover disfunção cerebral no paciente séptico.

Disfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é um fenômeno comum durante sepse severa, contribuindo, ao menos em parte, para a diminuição da sensibilidade vascular a vasopressores (443). Choque séptico pode, além disso, estar associado à deficiência de vasopressina. No entanto, a discussão de quais níveis de cortisol ou vasopressina são "adequados" em sepse é controversa e, por si só, limita bastante a compreensão do que está ocorrendo com tais substâncias.

Os níveis de vasopressina podem se encontrar inapropriadamente baixos em sepse, por fatores tais como, aumento do "clearance" plasmático, depleção das reservas, diminuição da sensibilidade do baroreflexo ou do osmoreflexo, ação de citocinas e óxido nítrico.

Disfunção autonômica foi observada em modelos animais de sepse e em pacientes sépticos, por análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca.

Mediadores inflamatórios são capazes de alterar o metabolismo celular, induzindo estresse oxidativo e disfunções mitocondriais (444), que resultam em anormalidades que variam de alterações da neurotransmissão até a morte celular por apoptose (445). Ademais, a sepse parece exercer uma ativação prolongada da microglia, promovendo a síntese e liberação de mais mediadores pró-inflamatórios (446, 447).

Interessante, foi descrito recentemente que a proteína β -amilóide, formadora de agregados característicos na Doença de Alzheimer, possui propriedades microbidas (448, 449). Com efeito, o estudo das doenças neurodegenerativas tem auxiliado significativamente na compreensão da fisiopatologia de fenômenos neuroinflamatórios complexos. Muitas dessas doenças, inclusive, parecem ser desencadeadas por agentes infecciosos (450-452).

As moléculas que têm me despertado maior interesse, entretanto, são os neuropeptídeos. Tais substâncias são um componente extremamente bem conservado em neurobiologia e em muito se assemelham aos peptídeos antimicrobianos.

Neuropeptídeos são candidatos interessantes a biomarcadores em sepse, porque são secretados por neurônios e participam em manifestações neuropsiquiátricas que são encontradas com frequência na encefalopatia séptica. Ademais, neuropeptídeos apresentam funções imunológicas, participando em diversos aspectos da imunidade, incluindo “killing” bacteriano direto (453). Tais funções colocam os neuropeptídeos em situação particular, podendo ser implicados tanto no acometimento cerebral, quanto na resposta inflamatória sistêmica em sepse (454). Com efeito, diversas publicações têm descrito um papel importante para muitas destas moléculas na fisiopatologia do choque séptico. Exemplos incluem substância P (455), α -MSH (456), oxitocina (457), neurotensina (458) e melatonina (459).

Em paralelo às suas funções como neuro-hormônios e neurotransmissores, uma multitude de outros efeitos têm sido descritos, colocando em evidência sua importância como reguladores de respostas imunes, tais como quimiotaxia, produção de espécies oxidativas do oxigênio, sinalização pró-inflamatória e diversas outras.

Os neuropeptídeos exercem sua ação, via receptores acoplados à proteína G. Centenas de receptores foram identificados, porém alguns neuropeptídeos permanecem sem receptor conhecido. Os neuropeptídeos são distribuídos de maneira heterogênea no sistema nervoso, sendo expressos por corpos celulares, dendritos e axônios. Provavelmente, a maioria dos neurônios produz algum neuropeptídeo ou algum outro neuromodulador, além dos neurotransmissores de ação rápida (460).

Neuropeptídeos modulam liberação sináptica de GABA e glutamato, assim como atividade pré e pós-sináptica. Neuropeptídeos têm sido implicados no controle de diversos processos celulares, incluindo termoregulação, consumo de água e alimentos, comportamento sexual, sono, locomoção, aprendizado, memória e respostas à dor e ao stress.

Nosso grupo demonstrou que os níveis séricos de neurotensina, substância P, oxitocina e α -MSH estão significativamente diminuídos em choque séptico (461) (**ANEXO G**). De maneira semelhante, nosso grupo também demonstrou diminuição dos níveis de LL-37 durante choque séptico (283). Interessante, neuropeptídeos e peptídeos antimicrobianos são duas famílias de proteínas que apresentam diversas similaridades. Ambas

famílias são evolutivamente conservadas, compostas por pequenos peptídeos sinalizatórios e apresentam funções efetoras multifacetadas (462-464).

É importante recordar que os neuropeptídeos são produzidos por neurônios, mas também por células periféricas e, portanto, a interpretação de seus valores séricos é complexa. Nós acreditamos que os neuropeptídeos promovem um círculo vicioso, causando disfunção cerebral e agravando inflamação sistêmica (454). Maiores estudos são necessários para compreendermos em que grau eles estão implicados nas manifestações neuropsiquiátricas da sepse.

7.7 Polimorfismos genéticos

A variabilidade genética dos pacientes sépticos é um fator que deve ser considerado, quando pensamos em predisposição do indivíduo à doença. A identificação de polimorfismos relacionados a um melhor ou pior prognóstico pode contribuir para o aprimoramento de métodos diagnóstico, melhor compreensão de suas bases moleculares e para o desenvolvimento de novos fármacos (465).

Leucócitos circulantes de voluntários saudáveis expostos a doses mínimas de LPS apresentaram aumento na transcrição de mais de 3600 genes (466), demonstrando a enorme quantidade de genes envolvidos na resposta do hospedeiro à infecção. Assim, é de se supor que variações genéticas nessas moléculas devam alterar a frequência e o curso da sepse (467).

Já se sabe que imunodeficiências geneticamente transmitidas podem predispor a infecções bacterianas e sepse (468). Mais recentemente, porém, demonstrou-se que mutações e polimorfismos de componentes de vias de sinalização da resposta imune também poderiam influenciar a evolução de pacientes sépticos. Os exemplos são múltiplos e esses polimorfismos podem ser encontrados em receptores de imunidade inata, como os receptores *Toll-like* (469), moléculas de sinalização intracelular e citocinas (470, 471).

Polimorfismos com troca de uma única base nitrogenada (SNPs) podem alterar a expressão ou função de produtos gênicos. Este tipo de polimorfismo é o tipo mais comum de variação genética estável na população (472), apresentando uma frequência de, pelo menos, 1% na população. Um SNP ocorre, aproximadamente, em uma para cada mil pares de base, e a substituição mais comum é a de uma citosina para uma timina. Estima-se que 10% de todos os SNPs do genoma humano sejam funcionais, apresentando potencial para alteração de processos celulares (472). Sabendo-se disto, uma das estratégias que tem sido usada na pesquisa em sepse, é a identificação de associações gene-doença, buscando-se elucidar o papel das variações genéticas na resposta inflamatória e no desenvolvimento da infecção. Para tal fim, a abordagem costuma ser do tipo caso-controle, em que um determinado SNP é escolhido e a diferença alélica dos pacientes afetados em relação aos indivíduos saudáveis é estabelecida.

Estudos epidemiológicos já demonstram o papel relevante da herança genética no desenvolvimento e no prognóstico da sepse. Foram detectados

no genoma humano, até o presente momento, mais de 12 milhões de SNPs (473).

As associações entre polimorfismos genéticos e sepse, desta forma, são extremamente relevantes, abrindo novos caminhos para o estudo da doença.

Os haplótipos do HLA são um dos fatores genéticos que se associam mais fortemente com autoimunidade (474). Desde a primeira descrição de forte associação entre HLA-B*27 e espondilite anquilosante (475), muitas outras associações a doenças imunes foram descritas. Embora essas associações tenham sido amplamente estudadas e documentadas, pouco se tem progredido na compreensão da influência de um haplótipo particular de HLA em cada doença. Alguns exemplos clássicos incluem a esclerose múltipla (476), a psoríase (477) e o diabetes tipo 1 (478). Contudo há algumas exceções, como o processo pelo qual a desaminação peptídica pode levar à doença celíaca (479), ou o cenário em que o mimetismo molecular, entre moléculas bacterianas e endógenas, pode produzir a doença de Lyme (480), cuja causa-efeito é bem mais clara. Estudos recentes sugerem que a contribuição do HLA à autoimunidade pode ser, inclusive, poligênica (481).

Além do mais, a importância dos HLAs vem crescendo em áreas como imunização (482, 483), antropologia (484) e farmacogenômica (485). Na verdade, algumas reações adversas medicamentosas demonstraram forte associação com HLA, como as descritas para abacavir (HLA-B*5701),

alopurinol (HLA-B*58) e carbamazepina (HLA-B*1502). Outras condições associadas ao sistema HLA incluem o hábito de fumar, esquizofrenia, doença de Parkinson, narcolepsia e doença arterial coronariana (486). Devido a esses efeitos multifacetados, o nosso grupo decidiu investigar os *loci* de classes I e II do sistema HLA como possíveis marcadores genéticos para suscetibilidade à sepse.

Este estudo incluiu 1.121 pacientes (1.078 doadores de rim, 20 pacientes com sepse grave e 23 pacientes admitidos por choque séptico). Foi identificada uma associação significativa entre HLA-A*31 e risco de sepse; os participantes positivos para HLA-A*31 tiveram um risco 2,36 vezes maior de desenvolver sepse do que os negativos para HLA-A*31. Não foi identificada em nossa análise qualquer outra associação significativa **(ANEXO H)**.

Polimorfismos genéticos das classes I e II do HLA são os alelos mais associados a doenças autoimunes. A região do HLA fica localizada no 6p21.3 e envolve mais de 400 genes. Tecnologias de genotipagem de SNPs identificaram diversos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) que conferem um risco muito alto de autoimunidade; entretanto, um forte *linkage disequilibrium* (desequilíbrio de ligação) da região gênica do HLA (487) complica essa interpretação.

É mais difícil encontrar associações importantes de HLA em doenças infecciosas, pois a maioria dos agentes infecciosos pode originar múltiplos epítomos, alguns dos quais com maior chance de ativar células T com avidéz suficiente do que outros. No entanto, algumas associações são bem

estabelecidas como, por exemplo, nas infecções por HIV, HTLV-1, malária, vírus da hepatite C, tuberculose e lepra.

Neste estudo, encontramos uma associação significativa entre HLA-A*31 e sepse. Não é simples identificar as razões pelas quais esse haplótipo específico dita suscetibilidade genética para uma síndrome tão complexa. Novos alelos de HLA-A*31 são frequentemente identificados (488-490), evidenciando que esse haplótipo se encontra sob forte pressão seletiva. Entretanto, a literatura que investiga o sistema HLA na sepse explora quase que exclusivamente a expressão de membrana de HLA-DR. Com efeito, numerosas publicações relacionam baixa expressão proteica de HLA-DR como um preditor de infecção (491) e mau prognóstico em sepse (492, 493), tendo este se tornado um popular marcador de imunossupressão adquirida na UTI (494-502). Em nosso estudo, contudo, a varredura genética completa do locus HLA-DR não foi capaz de encontrar qualquer alelo mais prevalente na população séptica. Assim, em nossa opinião, a baixa expressão de HLA-DR na membrana celular é apenas um marcador de exaustão celular.

HLA-A*31 é expressa em 5 a 10% da população mundial, sendo expressa com elevada frequência em ameríndios brasileiros (65%) e não sendo encontrada na população esquimó (0%). O HLA-A*31 é associado com reações adversas à carbamazepina na população japonesa e reconhece um antígeno codificado por carcinoma gástrico (*signet ring cell carcinoma*) (503, 504). Na verdade, HLA-A*31 tem sido um alvo para o desenvolvimento de vacina contra câncer (505). É interessante que, quando realizamos uma pesquisa BLAST para investigar esse peptídeo,

encontramos uma forte similaridade com uma proteína hipotética da *Pseudomonas aeruginosa*.

Mais de mil alelos de HLA-A e HLA-B foram caracterizados (506). Seria interessante decifrar os peptídeos que se ligam ao HLA-A*31 e, dessa forma, propiciam sepse grave e choque séptico. *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) foram os responsáveis por mais de 90% das infecções hospitalares do nosso estudo.

O sequenciamento de proteínas apresentadas pelo HLA em células apresentadoras de antígenos (APCs) revelou predominantemente moléculas autólogas (507). Além disso, moléculas citoplasmáticas ou nucleares corresponderam a 10-30% desses peptídeos (508, 509).

Uma grande porção de proteínas é imediatamente degradada após a síntese, em função de fatores como transcrição ou tradução defeituosa, falhas na montagem de complexos proteicos ou falhas de ubiquitinação (510, 511).

É interessante que achados recentes demonstram que, além da apresentação cruzada, células T CD8+ podem ser ativadas por meio da transferência de complexos contendo peptídeos ligados a HLA de classe I, provenientes da superfície de células infectadas, para APCs não-infectadas, em um processo que foi denominado “*cross-dressing*” (512). Parece que o mecanismo envolvido nesse processo é a trogocitose. Seja qual for a origem, o HLA-A*31 é um marcador interessante para suscetibilidade à sepse e seu potencial como biomarcador precisa continuar a ser investigado.

Nosso estudo tem como ponto forte o fato de ser o primeiro a demonstrar uma associação entre HLA-A*31 e risco de sepse. Além disso, ele incluiu como controle uma população homogênea de pacientes saudáveis, doadores de rim. Ele tem, entretanto, importantes limitações. O tamanho da amostra de pacientes sépticos foi pequeno. Além disso, não colhemos os dados demográficos dos pacientes.

É necessário que se conduzam mais investigações para investigar os mecanismos envolvidos na atividade do HLA-A*31 em sepse. Em um futuro próximo, essa molécula pode ser um marcador útil para ajudar os médicos na identificação de pacientes com maior propensão ao desenvolvimento de infecções graves.

7.8 Sepse no paciente com trauma grave

Trauma é a principal causa de óbito em indivíduos entre 1 e 44 anos de idade (513) e os pacientes que sobrevivem as primeiras 48-72 horas após trauma grave, com frequência, morrem de infecção nosocomial. O diagnóstico de infecção, nesta população, é ainda mais desafiador. Como graves injúrias neurológicas e ortopédicas também deflagram resposta inflamatória explosiva, é muito difícil para o clínico detectar a presença de infecção, baseando-se em sinais e sintomas como febre, leucocitose, frequência respiratória ou cardíaca. As hemoculturas, muitas vezes, são negativas mesmo na presença de infecção e um biomarcador confiável ainda não existe, apesar dos exaustivos esforços direcionados para este fim.

Lipídeos são moléculas ubíquas que participam de uma miríade de

funções celulares. Não são apenas componentes estruturais e segundo-mensageiros celulares, eles também servem como ligantes para receptores e se ligam covalentemente a proteínas, gerando modificações pós-traducionais. Reações de lipidação, incluem, N-miristilação, S-palmitolação e prenilação. Lipídeos, além disso, estão envolvidos numa multitude de processos enzimáticos, gerando milhares de substratos intermediários que, provavelmente, apresentam muitas funções desconhecidas.

Metabolômica e lipidômica são ferramentas poderosas, capazes de rastrear pequenas moléculas presentes em amostras biológicas. Tal informação permite aos cientistas, entender os mecanismos subjacentes a uma determinada doença. A lipidômica é um campo relativamente recente de pesquisa que tem sido impulsionado pelos rápidos avanços tecnológicos em espectrometria de massa, espectroscopia por ressonância magnética e métodos computacionais (514).

Neste sentido, decidimos realizar um estudo piloto para investigar estruturas lipídicas como potenciais marcadores de infecção em amostras plasmáticas de pacientes críticos com trauma grave. Para atingir tal objetivo, estabelecemos colaboração com o **Prof. Dr. Luiz Marcelo Sá Malbouisson**, supervisor da Unidade de Terapia Intensiva das Disciplinas de Cirurgia Geral e do Trauma do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Amostras de sangue de 11 pacientes do sexo masculino com trauma grave (*Injury Severity Score* ≥ 18) foram coletadas no momento em que eles

foram admitidos na UTI. Os pacientes foram acompanhados neste protocolo por 7 dias. Pacientes que desenvolveram choque séptico neste período tiveram uma segunda amostra de sangue colhida, no momento em que foi instituído suporte hemodinâmico com droga vasoativa. Para os pacientes que não infectaram, uma segunda amostra foi colhida no sétimo dia de internação. 7 dos pacientes incluídos neste estudo desenvolveram choque séptico e 4 não infectaram. O soro destes pacientes foi separado por centrifugação e as amostras foram enviadas para análise lipídômica por espectrometria de massa.

Dez estruturas lipídicas foram identificadas como potenciais marcadores de sepse: ácido 7-bromo-5-heptinóico, ácido octadecanóico, heptadecasfinganina, derivados da dihidroxivitamina D3, dihidroxicoesterol, docosaheptaenoilglutamina, derivados da fosfocolina, derivados da fosfoetanolamina, derivados da glicero-3-fosfoserina e N-esfinganina-1-fosfo-(1'-mio-inositol) (**ANEXO I**).

Trauma deflagra uma sequência complexa de cascatas celulares, caracterizadas por uma multiplicidade de vias de sinalização interrelacionadas (515-518). Uma compreensão clara e detalhada destas redes de sinalização é algo longe da nossa realidade, porém tecnologias recentes têm permitido uma melhor visão global destes eventos moleculares. Triagem de alta produtividade ("high-throughput screening") permite ao pesquisador conduzir com rapidez, milhões de testes químicos, genéticos e farmacológicos. Os resultados destes experimentos fornecem informação valiosa sobre moléculas que permaneciam ignoradas e um ponto de começo

para futuras investigações (519, 520).

Dentre as estruturas lipídicas identificadas no nosso estudo, muitas delas não têm uma função biológica bem definida em inflamação. O ácido heptinóico, por exemplo, é um ácido graxo insaturado sob investigação, devido às suas propriedades como inibidor da óxido nítrico sintase. Ácido octadecanóico, também conhecido como ácido esteárico, é um dos ácidos graxo saturados mais comuns na natureza. Em estudos epidemiológicos, o ácido esteárico foi associado a baixos níveis de colesterol LDL, quando comparado a outros ácidos graxos saturados (521). Heptadecasfinganina é um esfingolípido. Esfingolípidos são uma categoria bastante diversa de moléculas que servem não somente como componentes de estruturas biológicas, mas também como reguladores de numerosas funções celulares (522).

Interessante, derivados da dihidroxivitamina D3 foram identificados no nosso estudo. O papel da vitamina D em sepse têm sido foco de investigação exaustiva por diversos especialistas, inclusive pelo nosso grupo (282).

Dihidroxicolesterol e outros oxisteróis são ligantes de receptores nucleares e têm sido apontados como potenciais biomarcadores para doenças neurodegenerativas, tais como Doença de Alzheimer e esclerose múltipla (523).

Docosaheptaenoilglutamina é um acil aminoácido endógeno. Pesquisa em lípidos tem demonstrado a existência de um grande número de novos

ácil aminoácidos. Existem relatos de diversos ácil aminoácidos que ativam receptores acoplados à proteína G (N-araquidonoil glicina e N-araquidonoil serina, por exemplo), assim como outros receptores (N-araquidonoil dopamina e N-ácil taurinas, por exemplo), sugerindo que ácil aminoácidos podem desempenhar funções de sinalização celular (524).

Fosfocolina é um intermediário na síntese de fosfatidilcolina, sendo o produto de uma reação catalizada pela colina quinase, que converte ATP e colina em fosfocolina e ADP. Fosfocolina é uma molécula encontrada, por exemplo, na lecitina. É também usada por nematódeos e por células da placenta humana como uma modificação pós-traducional que serve para suprimir determinadas funções imunes (525). Interessante, também é um dos alvos de ligação da proteína-C reativa (PCR) (526).

Fosfoetanolamina é um derivado da etanolamina que é usado na síntese de esfingomielinas, um esfingolípido encontrado nas células da membrana de mamíferos. Fosfoserina, por outro lado, é um éster de serina e ácido fosfórico. Fosfoserina é um componente de diversas proteínas, sendo uma modificação pós-traducional. Finalmente, N-esfinganina-1-fosfo-(1'-mio-inositol) é uma enzima que participa no metabolismo de esfingolípidos.

Nós acreditamos que estas e outras estruturas lipídicas têm um grande potencial de servir como biomarcadores em sepse. A biologia de sistemas está provendo um ponto por onde podemos começar, porém estamos longe de compreender a real importância destes achados.

Estruturas lipídicas devem regular inesperadas rotas moleculares em

sepsis. O seu papel em inflamação, imunidade e infecção precisa continuar a ser investigado, assim como seu potencial para auxiliar os médicos no diagnóstico e tratamento de infecções devastantes.

8. Conclusão

- Sepsé é uma síndrome complexa que envolve uma intrincada rede de vias de sinalização celular
- A resposta imuno-inflamatória em sepsé é muitas vezes redundante e pleiotrópica
- Intervenção em um único componente desta rede tem se demonstrado uma estratégia terapêutica ineficaz
- Estudos clínicos, em conjunto com experimentos animais e em linhagens celulares, nos parece a melhor abordagem para evoluirmos na compreensão desta doença
- Estamos realizando acompanhamento temporal de pacientes críticos, antes, durante e depois do aparecimento de sinais e sintomas de infecção
- Tal abordagem, em conjunto com técnicas clássicas de Imunologia e técnicas avançadas de Biologia de Sistemas, está nos fornecendo informações valiosas sobre as bases moleculares da sepsé
- Estudos futuros precisam ser desenhados para um melhor entendimento dos efeitos dos peptídeos antimicrobianos no núcleo celular, assim como a razão pela qual sua expressão se encontra diminuída em choque séptico

- Bloqueio da sinalização inibitória induzida por *E. coli* sobre o CD16 é uma nova perspectiva terapêutica com excelente potencial em sepse, já que permite ação sobre diversas vias de sinalização celular com uma única droga e bloqueio de mecanismo bacteriano de evasão do sistema imune
- Técnicas de Biologia de Sistemas são capazes de identificar inúmeras outras moléculas com papel crítico na fisiopatologia da sepse e muitas destas moléculas podem servir no futuro como biomarcadores desta doença
- Integração da Imunologia com a Biologia de Sistemas é uma interessante avenida para se avançar na pesquisa científica em sepse e tal abordagem multidimensional, utilizando tanto material humano, quanto experimentos em animais e *in vitro*, é o caminho que pretendemos trilhar nos próximos anos
- Esperamos, desta forma, desvendar aspectos relevantes dos mecanismos que levam a uma resposta imuno-inflamatória explosiva, propor novos biomarcadores e opções terapêuticas
- Afinal, somente a incansável busca de novos caminhos é capaz de nos levar a novas respostas e a novas soluções

Anexos

Anexo A - Pinheiro da Silva F et al. Inhibitory ITAMs: a matter of life and death. *Trends Immunol.* 2008 Aug;29(8):366-73.

Inhibitory ITAMs: a matter of life and death

Fabiano Pinheiro da Silva^{1,2,3*}, Meryem Aloulou^{1,2*}, Marc Benhamou^{1,2} and Renato C. Monteiro^{1,2}

¹INSERM U699, University of Paris 7, Paris F-75018, France

²Bichat Medical School, University of Paris 7, Paris F-75018, France

³Emergency Medicine Department, University of Sao Paulo, BR Sao Paulo 01246-903, Brazil

The balance between activating and inhibitory signals is essential to control immune responses to microorganisms. Innate and adaptive immune responses are regulated by receptors that signal through either an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) or an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM). When clustered, these motifs are, respectively, responsible for activating and inhibitory signals. Recently, the concept of inhibitory ITAM (ITAM_i) has emerged as a new means to negatively control the immune response. In this Opinion, we will discuss the ability of *Escherichia coli* to evade the immune system by eliciting ITAM_i function through FcγRIII (CD16) on phagocytes leading to uncontrolled systemic infection and sepsis. Elucidating such mechanisms will open opportunities for specific therapeutic manipulation of ITAM_i-based signaling pathways.

Introduction

Immunoreceptors without intracytoplasmic signal transduction domains are associated noncovalently with subunits that sense receptor clustering and subsequently initiate defined signaling pathways [1]. These transmembrane adaptors contain one or more cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs), characterized by the consensus sequence YxxL/I-(x)₀₋₄-YxxL/I. The family of ITAM-bearing transmembrane signaling adaptors includes the CD3γ, δ, ε and ζ subunits of the T-cell receptor (TCR); Igα and Igβ of the B-cell receptor (BCR); DAP12, which is associated with several natural killer (NK) and myeloid receptors; the γ chain of FcεRI (FcRγ), which associates with several FcRs as well as other myeloid and NK receptors.

Multimeric ligation of these receptors leads to the tyrosine phosphorylation of ITAMs by Src family kinases (Figure 1). These phosphotyrosines serve as docking sites for the recruitment of other tyrosine kinases such as spleen tyrosine kinase (Syk) and/or ζ chain-associated protein kinase of 70 kDa (ZAP-70), which bind the phosphorylated ITAMs through their tandem src homology 2 (SH2) domains, resulting in a well-characterized activation of many downstream signaling pathways. These pathways include phospholipase C-γ (PLCγ) activation, leading to

calcium influx and Ras activation upstream of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade. Many types of cellular function are dependent on ITAM integrity such as phagocytosis, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), cytokine release, superoxide release and antigen presentation [2]. Thus, ITAM molecular motifs have emerged as key components for the activation of the immune response.

The emerging concept of inhibitory ITAM (ITAM_i)

Growth inhibition, anergy, apoptosis, downregulation and abrogation of activating signals are some of the inhibitory mechanisms used by the immune system to control cell functions [3]. Cell responses are, in many ways, controlled by a balance of antagonistic signals. This balance is of great importance to prevent damage to tissues through immunopathology and to return activated cells to a resting state. Abortion of activating signals is also mandatory to prevent autoimmune disease. A classical model of negative signaling in the immune system involves phosphatases that prevent or abort kinase-dependent activating signals. Inhibitory receptors containing immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) in their cytoplasmic domain [4] co-aggregate with ITAM-containing activating receptors. Kinases associated with the ITAMs induce the tyrosine phosphorylation of the juxtaposed ITIMs. This results in the recruitment of phosphatases to the phosphorylated ITIMs, which are exquisitely localized to abrogate the ITAM-dependent positive signal. Thus, ITAM-containing receptors were considered for many years to be under the control of the antagonistic ITIM-containing receptors, and it was widely accepted that ITAMs themselves were unable to induce inhibition.

After the first description of ITIM-bearing inhibitory receptors in NK cells, others have been identified in a growing number of cell types, including monocytes, macrophages, dendritic cells (DCs) and T and B cells. Examples of inhibitory receptors include FcγRIIb (a low affinity FcR for IgG), members of mouse Ly49 family of major histocompatibility complex (MHC)-recognition proteins such as paired-immunoglobulin receptors (PIRs), killer Ig-like receptors (KIRs) and Ig-like transcript (ILT) receptor families and their corresponding human counterparts [4]. The latter receptors are all characterized by pairing inhibitory and activating forms that recognize the same ligands, and the response is believed to be an outcome of

Corresponding author: Monteiro, R.C. (Renato.Monteiro@inserm.fr).

* These authors contributed equally to this work.

Figure 1. Proposed model of the dual activating and inhibiting function of certain Fc receptors containing an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). (Left panel) Aggregation of receptors by multimeric ligand results in full phosphorylation of ITAM tyrosines associated adaptors (such as Fc γ R) by Src family kinases. This phosphorylation creates a docking site for Syk (spleen tyrosine kinase), which associates with the phosphorylated ITAM of the adaptor through their Src homology (SH2) domains. Binding of Syk SH2 domains to the phosphorylated ITAM activates the kinase's enzymatic activity, leading to phosphorylation of other signaling adaptor proteins such as linker for activation of T cells (LAT) or linker for activation of T cells 2 (LAT2). These phosphorylated adaptors then recruit several downstream molecules such as phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and phospholipase C γ (PLC γ), which are also tyrosine phosphorylated by Syk to form a signaling complex at the cell membrane. Through activation of their functions, downstream cellular responses occur, such as calcium mobilization and activation of Akt, protein kinase C (PKC) and extracellular signal-regulated kinase (Erk). This signaling induces an Erk-dependent activating feedback loop that amplifies the positive signaling. This in turn induces cell-specific function responses such as phagocytosis, cytokine synthesis, proliferation and degranulation. (Right panel) Monomeric or low-affinity ligand binding results in partial phosphorylation of ITAM tyrosines by Src family kinases, resulting in partial Syk recruitment but recruitment of inhibitory phosphatase SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP-1). Syk kinase activity leads to low-intensity signaling including phosphorylation of Erk. Subsequently, SHP-1 dephosphorylates signalling effector molecules including Erk. Activated Erk amplifies the progressive recruitment of SHP-1 to the cell membrane at a threshold level that would in time allow the dephosphorylation of other signalling pathways activated by engagement of an heterologous receptor.

the prevailing signal. All of these receptors have members that recognize class I MHC.

Although largely accepted for decades as a working paradigm, some sparse publications have, in recent years, questioned this strict polarity attributed to ITAMs and ITIMs as molecular motifs with opposing functions. The first such reports demonstrated that tyrosine phosphorylated ITAM from aggregated Fc ϵ RI (a high-affinity FcR for IgE) or Fc γ RIIIa (a low-affinity FcR for IgG) can recruit the SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP-1 or SHP-2), respectively [5,6], suggesting that the ITAM motif could generate both activating signals and their corresponding control mechanism. Consistent with this, further findings demonstrated that ITAMs are also capable, under defined conditions, to induce negative responses (Table 1). The first evidence for this described how the ITAM-containing Fc γ R that pairs with the IgA-specific Fc receptor (Fc α RI or CD89) could mediate inhibition of heterologous ITAM-bearing receptors and down-regulate inflammation in an animal model of asthma [7]. This Fc γ R adaptor associated with Fc α RI was found to inhibit IgG-mediated phagocytosis in monocytes, as well as IgE-mediated degranulation in mast cells after targeting of Fc α RI by a monovalent ligand. Fc γ R adaptor can also mediate inhibition of Toll-like receptor (TLR) signaling

in human plasmacytoid DCs when associated with the ILT-7 receptor [8]. Interestingly, another adaptor containing the ITAM motif, DAP12, was also found to negatively regulate TLR and Fc γ R signaling in macrophages and inhibit inflammatory cytokine production [9]. Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM-2) was shown to be the receptor responsible for this inhibitory signal [10,11]. DAP-12 was also shown to mediate inhibition

Table 1. Receptors containing, or associated with, an adaptor containing an ITAM motif that can induce inhibitory signaling

Receptor	Associated adaptor	Phosphatase	Refs
Fc α RI	Fc γ R	SHP-1	[7]
Fc γ RIIIa	None	SHP-1, SHP-2	[6,47]
Fc γ RIIIb	Fc γ R	SHP-1	[23]
Fc α RI	Fc γ RIIIb	SHP-2	[5]
TREM2	DAP12	Unknown	[10,11]
TCR	CD3 ζ	SHP-1	[16]
BCR	Ig α	Unknown	[48,49]
MHC II	Fc γ R	SHP-1	[14]

Abbreviations: BCR, B-cell receptor; CD3 ζ , a subunit of TCR; DAP-12, DNAX activating protein of 12 kDa; Fc γ R, a common subunit of Fc receptors; Fc α RI, high affinity IgA Fc receptor; Fc α RII, high affinity IgE Fc receptor; Fc γ RIIIa, a subunit of Fc γ RIII; Fc γ RIIIb, low-affinity IgG Fc receptor; Fc γ RIIIc, low-affinity IgG Fc receptor; Ig α , a subunit of BCR; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; SHP, Src homology [SH2] domain-containing inositol phosphatase; SHP-1, src homology 2 [SH2]-containing tyrosine phosphatase 1; TCR, T-cell receptor; TREM, Triggering receptors expressed by myeloid cells.

through two additional receptors, highly NK-specific receptor (NKP44) and sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin H (Siglec-H) in human and mouse plasmacytoid DCs [12,13]. In both situations, an intact ITAM in the adaptor molecule that is associated with the inhibiting receptor was an absolute requirement for inhibition. Recently, it has been shown that MHC class II/lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) interaction *in trans* suppresses DC maturation and immunostimulatory capacity through an ITAM-mediated inhibitory signaling involving Fc γ R associated with MHC II [14]. This large body of information on inhibition through ITAM-bearing adaptors has recently prompted us to define this particular inhibitory configuration of the ITAM as inhibitory ITAM or ITAM_i [15] (Figure 1).

In the Fc α RI case, the ITAM under its ITAM_i configuration was weakly phosphorylated on tyrosine after monovalent targeting (so-called 'inhibitory conditions') compared with the strong ITAM phosphorylation resulting from the stable clustering of this receptor. This Fc γ R-associated ITAM was shown to mediate inhibition of heterologous ITAM-bearing receptors and to counteract inflammation by the recruitment of SHP-1 phosphatase, whereas activation through the Fc γ R-associated activating receptor strongly recruited the tyrosine kinase Syk. The recruitment of SHP-1 to the Fc α RI-Fc γ R complex under 'inhibitory conditions' and its subsequent recruitment to the heterologous receptor (e.g. Fc α RI) contributed to a strong cellular desensitization with reduced phosphorylation of Syk, the linker for activation of T cells (LAT) and ERK. This observation provided an important clue for the mechanism that drives ITAM_i-induced intracellular signal inhibition. An analogous mechanism had been described previously for TCR synergism and antagonism, where SHP-1 recruitment inhibited an homologous receptor [16].

Although in the case of Fc α RI, the ITAM_i function is dependent on SHP-1 [15], it might also involve Syk. This hypothesis is based on the observation that Syk is recruited to Fc α RI-associated Fc γ R under inhibitory conditions [7] and on the fact that inhibition of TLR by DAP12-associated receptors is not observed in Syk-deficient cells [9]. Thus, it is tempting to propose that, before recruitment of SHP-1 to ITAM_i-bearing receptors, a preactivation phase needs to take place allowing a weak phosphorylation of the ITAM after monovalent targeting that might be dependent on src kinases such as Lyn. This weak phosphorylation would transform the ITAM in an ITAM_i configuration. These weak stimulating conditions would initiate a low-intensity signaling (low phosphorylation of Fc γ R, Syk and ERK), leading to a progressive recruitment of SHP-1 at the plasma membrane. This would be in agreement with our observation that induction of a functional ITAM_i requires something of a lag time [7]. Once the ITAM_i-recruited SHP-1 has reached a significant threshold level at the plasma membrane, it would in time be able to dephosphorylate signaling proteins recruited by the heterologous receptor as is the case for Fc α RI (Figure 1). By contrast, during multimeric cross-linking of Fc α RI, a high-intensity signaling pathway is triggered (high phosphorylation of Fc γ R, Syk and ERK), where Syk is strongly and rapidly recruited to Fc α RI favouring an activation signal in which SHP-1

recruitment is aborted. Thus, ERK critically participates both in an activating pathway that originates from Syk extensive recruitment to a strongly phosphorylated ITAM and in an inhibitory pathway that involves SHP-1 recruitment to a weakly phosphorylated ITAM. Although the exact role of Syk in the recruitment of SHP-1 and in inhibitory signaling remains unknown, we propose that partial activation of Syk by ITAM_i could activate and favor recruitment of SHP-1 to this motif (Figure 1).

One particularity of ITAM_i configuration is that it does not necessarily require co-ligation between the inhibitory receptor and the targeted receptor [7], differing from ITAM-bearing receptors that usually act after cross-linking between both type of receptors [3,4]. Indeed, monovalent targeting of Fc α RI can induce a strong inhibitory signal as shown for monomeric IgA or anti-Fc α RI Fab fragments [7]. Nevertheless, it should be stressed that not all ITAM_i-bearing receptors may act without co-ligation because it has been shown that cross-linking of DAP12-associated receptors (e.g. NKP44) with monoclonal antibodies (mAbs) leads to the transduction of some inhibitory signals [12]. One can therefore propose that small aggregates such as those induced by mAb cross-linking can be inhibitory as a consequence of partial phosphorylation of the ITAM tyrosines leading to recruitment of SHP-1 instead of Syk. Thus, we can also speculate that small-sized immune complexes may also operate under certain conditions as inhibitors of immune system, whereas large-sized immune complexes fully activate the cells. Supporting this hypothesis, it has been shown that polymeric IgA, which can cross-link Fc α RI, can mediate inhibition of IgG-mediated phagocytosis or chemotaxis [17,18].

A variety of inhibitory functions have recently been described for receptors associated with ITAM_i-containing adaptors such as inhibition of IgG phagocytosis, IgE degranulation, cytokine release, TLR-induced cytokine release, T- or B-cell activation and prevention of autoimmune disease. These functions have also been suggested in humans where IgA-deficient patients that lack Fc α RI-mediated inhibition are associated with a high frequency of asthma and autoimmune disease [19]. Interestingly, apoptosis has also been described to be mediated by ITAM_i in the context of the Fc α RI in a SHP-1-independent pathway, but the detailed molecular mechanisms underlying this await identification [20].

The ITAM_i pathway is used by bacteria for immune evasion and plays a critical role in sepsis

To address other possible ITAM_i-mediated inhibitory functions, we sought to understand the functions of the Fc γ R adaptor in septic shock triggered by cecal ligation and puncture (CLP), which is an experimental model of peritonitis and sepsis. This disease is a major health problem and a leading cause of death worldwide. Morbidity is mostly caused by a lack of effective specific treatments arising from a poor comprehension of its molecular aspects [21,22]. Sepsis results from the body's systemic overresponse to bacterial infection, which disrupts homeostasis through an uncontrolled cascade of inflammation, coagulation and impaired fibrinolysis. Antibiotics can be used to control the infection itself, but widespread and inappropriate

Table 2. Molecules used by bacteria for immune evasion

Bacteria	Pathogen protein	Host ligand	Action	Refs
<i>Staphylococcus</i> spp.	Staphylokinase	C3b, IgG	Cleaves complement proteins, removes C3b from surface	[50]
	Staphylococcal superantigen-like protein 7	C5	Prevents C5 cleavage	[51]
	<i>S. aureus</i> protein A	IgG	Inhibit phagocytosis	[52]
	Eap	ICAM-1	Prevents leucocyte adhesion, diapedesis and extravasation	[53]
<i>Streptococcus</i> spp.	BAC-Protein	IgA, β H	Recruitment of regulators	[54]
	Pneumolysin	IgG, C1q	Complement activation/depletion	[55]
	GAS Mac-1-like	Fc γ RIIIB	Inhibits phagocytosis and production of reactive oxygen species	[56]
<i>Escherichia</i> spp.	Outer membrane protein A	C4BP	Recruitment of regulators	[57]
	Secreted protease of C1 esterase inhibitor	C1-INH	Recruitment of C1-INH	[58]
	TraT outer membrane protein	C5b6	Prevents MAC formation	[59]

Former names: complement component (C3b, C5, C1q, C5b6); immunoglobulin (Ig); extracellular adherence protein (Eap); intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1); β antigen C-protein (BAC-Protein); factor H (β H); group A *Streptococcus* leukocyte integrin α Mp2-like (GAS Mac-1-like); C4-binding protein (C4BP); C1 esterase inhibitor (C1-INH); Membrane-attack complex (MAC).

ate use of antimicrobial drugs promotes the emergence of drug-resistant bacteria. Another therapeutic strategy in sepsis could be based on boosting the immune system by targeting the mechanisms of immune evasion used by bacteria. Indeed, many such mechanisms have been described, and bacteria have been shown to manipulate every line of defense to survive in the host (Table 2). Therefore, the understanding of these mechanisms constitutes a fundamental chapter for the elucidation of the pathological basis of bacterial infections.

The role of the Fc γ adaptor in bacterial infections has never been precisely evaluated, but it is thought to play a protective role through its triggering of ADCC and phagocytosis after antibody–FcR interaction. Surprisingly, we recently observed [23] that the absence of Fc γ was highly beneficial for the host during peritoneal sepsis because mice knocked-out for the Fc γ -encoding gene showed markedly increased survival, together with a lower level of *Escherichia coli* bacteremia. Because Fc γ RI (a high-affinity FcR for IgG) and Fc γ RIII (a low-affinity FcR for IgG) are each physically associated with Fc γ , we examined which one was responsible for the observed inhibitory effect. Mice lacking Fc γ RI were as sensitive to CLP as wild-type mice. However, unexpectedly, Fc γ RIII-deficient mice were resistant to CLP, demonstrating that this receptor is strongly responsible for the high mortality found in wild-type mice. Indirect evidence for involvement of the Fc γ RIII in sepsis was shown in peritoneal macrophages of mice deficient for Fc γ RIIb by upregulation of its expression and the increased phosphorylation of associated Fc γ 2h after CLP as detected by anti-Fc γ RII/III 2.4G2 mAb [23]. Nevertheless, future studies are needed to demonstrate *in vivo* involvement of Fc γ RIII in sepsis.

Analysis of phagocytosis of *E. coli* by phagocytes from wild-type and Fc γ -knockout animals revealed that the Fc γ strongly inhibited phagocytosis of the bacteria. In wild-type phagocytes, IgG favoured phagocytosis of *E. coli*. However, even in the presence of IgG, this phagocytosis was strongly impaired compared with Fc γ -knockout cells. This was unexpected because the Fc γ RIII–Fc γ had been always thought to play a full protective role in the presence of antibody immune complexes. Indeed, Fc γ RIII plays a critical role in inflammatory responses, as well as in immune complex-mediated reactions [24,25] as assessed

with Fc γ RIII-deficient mice. The role of this receptor in phagocytosis, however, was determined with IgG-opsonized sheep red blood cells (SRBCs) in Fc γ -deficient and wild-type mice [26]. Our experiments demonstrate that SRBC are not the most relevant model to study the involvement of Fc γ RIII in bacteria phagocytosis because human and murine Fc γ RIII are able to bind *E. coli* in an opsonin (immunoglobulin)-independent manner [23,27]. Our observation that opsonins fail to allow full phagocytic capabilities against bacteria may reflect either that opsonization of the bacteria was not optimal to fully overcome inhibition by ITAM_i or that the inhibition promoted by ITAM_i is stronger than the activation induced by ITAM.

Phagocytosis of the bacteria was not the only parameter affected by the absence of Fc γ . The intracellular killing of *E. coli* started after a lag time of 30 min in wild-type phagocytes, whereas it was immediately effective in knock-out cells. The reason for this observation is still unclear but indicates that the ITAM_i inhibition may extend beyond the mechanism of phagocytosis *per se*. At any rate, all these observations are indicative of the strength of the ITAM_i inhibitory pathway in sepsis.

Whereas phagocytosis through Fc γ RIII is promoted through recruitment of signal effectors such as Syk to the phosphorylated ITAM, a different pathway responsible for the inhibition was identified. First, the Fc γ chain of Fc γ RIII was constitutively phosphorylated and associated with Syk and SHP-1 even before any contact with the bacteria. In addition, this ITAM_i motif was functional because it could convey an inhibition of the phosphorylation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Thus, the role of Fc γ RIII might not be limited to IgG-dependent responses. Our data suggest that it could be a candidate participating in self-tolerance mechanisms, because this constitutive IgG-independent signal can be attributed to an as yet unidentified self-ligand, which dampens cell activation. Nevertheless, we cannot rule out that *in vivo* transient occupation of the low-affinity Fc γ RIII by some of the IgG subclasses such as IgG2a or IgG2b, which have more affinity for this receptor than IgG1 [28], can play an inhibitory role on the immune system.

This type of inhibitory signal, although important to avoid autoimmune disease, might facilitate bacteria overgrowth, as shown for *E. coli* (Figure 2). Interestingly, one

Figure 2. Model summarizing the role of Fc γ RIII in sepsis. Low avidity: during phagocytosis of nonopsonized *E. coli*, the bacteria interact directly with low-affinity FcR for IgG (Fc γ RIII) together plus several other receptors such as macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) and Toll-like receptor 4 (TLR4). This interaction induces partial phosphorylation of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) present in the Fc γ associated with Fc γ RIII, leading to weak recruitment of spleen tyrosine kinase (Syk) and extensive recruitment of inhibitory phosphatase SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP-1), as well as co-aggregation of Fc γ RIII, TLR4 and MARCO. We propose that the ligation of Fc γ RIII by nonopsonized *E. coli* would facilitate the recruitment of SHP-1 by MARCO. This leads to deactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activated by MARCO, resulting in a low phagocytic response. This would also lead to minimal PI3K-dependent inhibition of TLR4-mediated cytokine production. This process would lead to sepsis in the case of systemic infection. High avidity: in the presence of IgG, the Fc γ RIII-dependent inhibitory pathway is partially abrogated. Fc γ RIII clustering by IgG-opsonized *E. coli* induces extensive phosphorylation of tyrosines within the ITAM motifs present in the Fc γ RIII-associated Fc γ subunits, resulting in an activating rather than inhibitory pathway. The phosphorylated ITAMs induce a strong recruitment of Syk kinase, which is required for efficient PI3K phosphorylation. PI3K promotes phagocytosis of *E. coli*. Despite *E. coli* opsonization by IgG, a low number of Fc γ RIII nonligated by IgG can interact directly with *E. coli*, inducing partial phosphorylation of their ITAM with the subsequent recruitment of the inhibitory phosphatase SHP-1. SHP-1 can partially inhibit the PI3K pathway. This mechanism would allow partial protection against sepsis. Absence of Fc γ RIII: the interaction of *E. coli* with innate receptors like MARCO leads to uninhibited activation of the PI3K-dependent pathway, which would negatively regulate TLR4 downstream signaling, resulting in a reduced tumor necrosis factor- α (TNF α) production. This would also lead to optimal phagocytosis of *E. coli*, promoting high protection in the course of sepsis.

study has shown that *E. coli* blocks phagocytosis by inhibiting a PI3K-dependent pathway [29] and another that phagocytosis depends on the type III secretion pathway and some virulence factors, such as EspA, EspB and EspD [30]. This second study, however, used a pathogenic strain of bacteria, whereas our data extend this antiphagocytic ability to *E. coli* from the normal intestinal flora and highlight a different mechanism of inhibition; indeed, type III secretion has not been described for commensal *E. coli*. In the case of commensal *E. coli*, inhibition is initiated by recruitment of SHP-1 to Fc γ RIII and is partly alleviated when this receptor is aggregated by IgG immune complexes. *Staphylococcus aureus* and zymosan were not able to evade phagocytosis in the same manner. Thus far, it remains unclear how *E. coli* can specifically inhibit phagocytosis; however, one can speculate that it might depend on the extracellular portion of the receptor, because these bacteria are able to bind directly to Fc γ RIII (better known as the receptor for IgG immune complexes) but not fungal zymosan or *S. aureus* [23,27].

The Fc γ RIII-Fc γ inhibitory mechanism is mediated by SHP-1 [23]. It is well known that SHP-1 dampens specific innate receptors, especially those mediating phagocytosis, through inhibition of the PI3K pathway, a key kinase in the control of phagocytic events [31]. Interestingly, recent data implicate PI3K as a negative feedback regulator that,

like interleukin 1 (IL-1) receptor-associated kinase-M (IRAK-M) [32] and suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) [33,34], limits proinflammatory responses, functioning at the early phase of TLR signaling, modulating its activation and preventing excessive immune responses [35]. Inhibition of PI3K activity with wortmannin increased the serum levels of proinflammatory cytokines and decreased the survival of mice subjected to CLP [36]. It was also reported that PI3K negatively regulates inflammatory tumor necrosis factor α (TNF α) production after TLR4 activation [37]. However, PI3K can also play a proinflammatory role by favouring the production of inflammatory cytokines. For instance, an impaired inflammatory response in PI3K-deficient mice has been reported [38]. PI3K has furthermore been implicated in autoimmune disorders, such as rheumatoid arthritis [39] and systemic lupus erythematosus [40]. Thus, PI3K seems to be an important point of control of inflammation, whose role might depend on which activation pathway is triggered and which cell is activated. Under conditions of infection, its role could be to avoid excessive inflammation and to promote protection. Accordingly, Fc γ RIII-deficient mice showed a decreased TNF α production compared with wild-type mice after lipopolysaccharide (LPS) stimulation [40]. Although it plays an inhibitory role in phagocytosis, the constitutive inhibitory signals generated from

Fc γ -associated Fc γ RIII are critical in inhibiting PI3K, which would in turn favor TLR4 signaling after LPS stimulation, resulting in enhanced TNF α production. This mechanism may be operating in the case of DAP-12 inhibition pathway because mice lacking these molecules (and macrophages derived from these mice) have decreased LPS-induced TNF α production at high doses of LPS comparable to that circulating in the body during septic shock [9,41].

The ITAM_i-dependent phagocytic inhibitory pathway initiated by Fc γ RIII downregulates other receptors that are directly implicated in *E. coli* uptake [23]. One of these receptors was identified as the macrophage receptor with collagenous structure (MARCO), the macrophage class A scavenger receptor (SR-A). This receptor is able to promote phagocytosis of bacteria in an opsonin-independent manner because SR-A-deficient macrophages ingest fewer *E. coli* than wild-type cells [42]. The Fc γ RIII-dependent inhibition of MARCO acts by substantial recruitment of SHP-1 to this receptor after stimulation by *E. coli*. Although the early events that control SHP-1 recruitment to MARCO remain unclear, co-aggregation of Fc γ RIII with MARCO induced by the bacteria may facilitate the action of SHP-1 to inactivate the PI3K pathway. Other phagocytic receptors must be also inhibited by Fc γ RIII, because *E. coli* phagocytosis by both macrophages and neutrophils is inhibited by Fc γ RIII, whereas MARCO is expressed only in macrophages. We suspect that any receptor involved in phagocytosis of *E. coli* and inducing the PI3K pathway could be a potential candidate in addition to MARCO. One such potential class of receptors is the integrin receptor family. It was recently reported that integrin receptors signaling in neutrophils and macrophages proceeds through ITAM phosphorylation [43] and that PI3K is implicated in cell activation by integrins in a pathway that is induced by Fc γ R ligation [44]. Interestingly, adhesion is required for the development of a full effector phenotype by phagocytes. For instance, Fc γ R-dependent phagocytosis depends on activated integrin receptors. Integrin receptors generally bind poorly to their ligands, unless the cell is first exposed to stimuli (such as bacterial products, cytokines or immune complexes), and PI3K is implicated in this regulation of integrin adhesiveness [45]. Bacteria frequently mimic integrin-receptor ligands for many purposes [46].

Thus, *E. coli* could have developed strategies to use Fc γ RIII to avoid phagocytosis and prolong their survival in the extracellular milieu. The higher production of cytokines might be the answer elaborated by the host to counter this *E. coli* strategy. Indeed, in the most general case of low local infection, the dampened phagocytic capacity of the cells would be compensated by the extensive recruitment of phagocytes on the robust production of inflammatory cytokines (such as TNF α) that are chemotactic for phagocytes. However, this counter-strategy would have found its limits in the case of extensive infection, because this would result in sepsis with the cellular arm of the innate immune response both impaired (low phagocytic capacity) and overreacting (too strong production of proinflammatory mediators).

These findings open new avenues for the treatment of bacterial infections: therapeutic intervention blocking the interaction between *E. coli* and Fc γ RIII and/or targeting

the Fc γ ITAM_i is expected to not only attenuate TNF α production but also to strongly stimulate *E. coli* phagocytosis, thereby alleviating circulating bacterial load. In other words, canceling an inhibitory mechanism used by *E. coli* is expected to rapidly and efficiently boost the immune response to infection by allowing the immune system to recover its powerful yet controlled self.

The study of bacterial immune evasion is a relatively new field of research, and the subject remains poorly understood, but its unquestionable importance is being increasingly appreciated. Our recent results have demonstrated that the ITAM_i configuration of the ITAM contained in the Fc γ -associated Fc γ RIII plays a deleterious role during acute *E. coli* bacteremia and a critical trigger for sepsis. Because it has opposing functions, we propose that Fc γ RIII probably operates as a multi-ligand receptor because (i) host cell interactions with nonopsonized *E. coli* via Fc γ inhibited bacterial phagocytosis, whereas interactions with opsonized *E. coli* partially alleviated this inhibition and (ii) Fc γ concomitantly inhibited phagocytosis and enhanced TNF α production. Although a full understanding of how *E. coli* mediates this complex Fc γ RIII evasion mechanism remain elusive, future studies should lead to the dissection of this unexpected phenomenon and to the development of therapeutic tools. In this regard, we are currently testing CD16 blocking mAb as a potential new treatment for human sepsis.

Conclusions

Molecular modules that relay signals transmitted by ligand-bound receptors are used extensively by immune and other cells. These modules allow a regulated association between signaling effector molecules. The consequence is that these modules can theoretically play different roles depending on which molecular association they promote within a given signaling pathway. The ITAM motif is such a module and was originally thought to act only to promote cell activation. This hypothesis must now be revised because the ITAM associated with a given receptor can also promote inhibition of activation signals generated by heterologous receptors. Although not yet formally established, our observation strongly suggests that the reason for such different functionality stems from the extent to which the tyrosines within this module are phosphorylated. Furthermore, the ITAM, under its inhibitory configuration, the ITAM_i, can play both a beneficial and a deleterious role. Indeed, whereas it could dampen an excessive immune response and thus prevent immunopathology, it can also be exploited by pathogens to evade the immune system and thus favour sepsis. Therefore, controlling the dual function of this module is an important issue that can determine the outcome of the immune response for the life or death of the host.

References

- 1 Humphrey, M.B. *et al.* (2005) Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol. Rev.* 208, 50–65
- 2 Hamerman, J.A. and Lanier, L.L. (2006) Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors. *Sci. STKE* 2006, e1
- 3 Long, E.O. (1999) Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 875–904

- 4 Vivier, E. and Daeron, M. (1997) Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol. Today* 18, 286-291
- 5 Kimura, T. et al. (1997) Syk-independent tyrosine phosphorylation and association of the protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 with the high affinity IgE receptor. *J. Immunol.* 159, 4426-4434
- 6 Ganesan, L.P. et al. (2003) The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Fc gamma RIa to modulate signaling events in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 278, 35710-35717
- 7 Pasquier, B. et al. (2005) Identification of Fc alpha RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of Fc gamma ITAM. *Immunity* 22, 31-42
- 8 Cao, W. et al. (2006) Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J. Exp. Med.* 203, 1399-1406
- 9 Hamerman, J.A. et al. (2005) Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nat. Immunol.* 6, 579-586
- 10 Hamerman, J.A. et al. (2006) Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J. Immunol.* 177, 2051-2055
- 11 Turnbull, I.R. et al. (2006) Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J. Immunol.* 177, 3520-3524
- 12 Fuchs, A. et al. (2005) Pam2cx6 inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood* 106, 2076-2082
- 13 Blasius, A.L. et al. (2006) Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* 107, 2474-2476
- 14 Liang, B. et al. (2008) Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.* 180, 5916-5926
- 15 Kanamaru, Y. et al. (2008) Inhibitory ITAM signaling by Fc(alpha)RI-FcR(gamma) chain controls multiple activating responses and prevents renal inflammation. *J. Immunol.* 180, 2669-2678
- 16 Stefanova, I. et al. (2003) TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat. Immunol.* 4, 248-254
- 17 Wilton, J.M. (1978) Suppression by IgA of IgG-mediated phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 34, 423-428
- 18 Van Epps, D.E. and Williams, R.C., Jr (1976) Suppression of leukocyte chemotaxis by human IgA myeloma components. *J. Exp. Med.* 144, 1227-1242
- 19 Jacob, C.M. et al. (2008) Autoimmunity in IgA deficiency: revisiting the role of IgA as a silent housekeeper. *J. Clin. Immunol.* 28, 56-61
- 20 Kanamaru, Y. et al. (2007) IgA Fc receptor I signals apoptosis through the Fc gamma ITAM and affects tumor growth. *Blood* 109, 203-211
- 21 Martin, G.S. et al. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348, 1546-1554
- 22 Hotchkiss, R.S. and Karl, I.E. (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 348, 138-150
- 23 Pinheiro da Silva, F. et al. (2007) CD16 promotes Escherichia coli sepsis through an Fc gamma inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nat. Med.* 13, 1368-1374
- 24 Hazenbos, W.L. et al. (1996) Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity* 5, 181-188
- 25 Maresco, D.L. et al. (1999) The SH2-containing 5'-inositol phosphatase (SHIP) is tyrosine phosphorylated after Fc gamma receptor clustering in monocytes. *J. Immunol.* 162, 6458-6465
- 26 Takai, T. et al. (1994) Fc gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76, 519-529
- 27 Salmon, J.E. et al. (1987) Opsonin-independent ligation of Fc gamma receptors. The 3G8-bearing receptors on neutrophils mediate the phagocytosis of concanavalin A-treated erythrocytes and nonopsonized Escherichia coli. *J. Exp. Med.* 166, 1798-1813
- 28 Nimmerjahn, F. and Ravetch, J.V. (2006) Fc gamma receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24, 19-28
- 29 Celli, J. et al. (2001) Enteropathogenic Escherichia coli mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J.* 20, 1245-1258
- 30 Gooseney, D.L. et al. (2000) coli translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. *Curr. Biol.* 10, 735-738
- 31 Amaki, N. et al. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* 135, 1249-1260
- 32 Kobayashi, K. et al. (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110, 191-202
- 33 Nakagawa, R. et al. (2002) SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 17, 677-687
- 34 Kinjo, I. et al. (2002) SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* 17, 583-591
- 35 Fukao, T. and Koyasu, S. (2003) PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol.* 24, 358-363
- 36 Williams, D.L. et al. (2004) Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* 172, 449-456
- 37 Guha, M. and Mackman, N. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocyte cells. *J. Biol. Chem.* 277, 32124-32132
- 38 Hirsch, E. et al. (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287, 1049-1053
- 39 Camps, M. et al. (2005) Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 11, 936-943
- 40 Barber, D.F. et al. (2005) PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat. Med.* 11, 933-935
- 41 Turnbull, I.R. et al. (2005) DAP12 (KARAP) amplifies inflammation and increases mortality from endotoxemia and septic peritonitis. *J. Exp. Med.* 202, 363-369
- 42 Peiser, L. et al. (2000) Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of Escherichia coli: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect. Immun.* 68, 1953-1963
- 43 Mosai, A. et al. (2006) Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat. Immunol.* 7, 1326-1333
- 44 Jones, S.L. et al. (1998) Two signaling mechanisms for activation of alphaM beta2 avidity in polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.* 273, 10556-10566
- 45 Shimizu, Y. and Hunt, S.W., 3rd (1996) Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase? *Immunol. Today* 17, 565-573
- 46 Brandhorst, T.T. et al. (2004) Exploiting type 3 complement receptor for TNF-alpha suppression, immune evasion, and progressive pulmonary fungal infection. *J. Immunol.* 173, 7444-7453
- 47 Nakamura, K. et al. (2002) The Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase negatively regulates Fc gamma receptor-mediated phagocytosis through immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing phagocytic receptors. *Blood* 100, 3374-3382
- 48 Kraus, M. et al. (1999) Ig-alpha cytoplasmic truncation renders immature B cells more sensitive to antigen contact. *Immunity* 11, 537-545
- 49 Kraus, M. et al. (2001) Interference with immunoglobulin (Ig) alpha immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) phosphorylation modulates or blocks B cell development, depending on the availability of an Ig beta cytoplasmic tail. *J. Exp. Med.* 194, 455-469
- 50 Rooijackers, S.H. et al. (2006) Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect.* 7, 476-484
- 51 Langley, R. et al. (2005) The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc alpha RI binding and serum killing of bacteria. *J. Immunol.* 174, 2926-2933
- 52 Palmqvist, N. et al. (2002) Protein A is a virulence factor in Staphylococcus aureus arthritis and septic death. *Microb. Pathog.* 33, 239-249
- 53 Chavakis, T. et al. (2002) Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat. Med.* 8, 687-693
- 54 Areschoug, T. et al. (2002) Streptococcal beta protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc. *J. Biol. Chem.* 277, 12642-12648
- 55 Mitchell, T.J. et al. (1991) Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol. Microbiol.* 5, 1883-1888

- 56 Lei, B. *et al.* (2001) Evasion of human innate and acquired immunity by a bacterial homolog of CD11b that inhibits opsonophagocytosis. *Nat. Med.* 7, 1298-1305
- 57 Prasadamo, N.V. *et al.* (2002) A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1. *J. Immunol.* 169, 6352-6360
- 58 Lathem, W.W. *et al.* (2004) Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7. *J. Exp. Med.* 199, 1077-1087
- 59 Pramoonjago, P. *et al.* (1992) Role of TraT protein, an anticomplementary protein produced in *Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance. *J. Immunol.* 148, 827-836

Anexo B – Pinheiro da Silva F et al. Neutrophils LL-37 migrate to the nucleus during overwhelming infection. *Tissue and Cell*. 2013 Oct;45(5):318-20.

Neutrophils LL-37 migrate to the nucleus during overwhelming infection

Fabiano Pinheiro da Silva^{a,*}, Maria Cristina Rodrigues Medeiros^b, Ângela Batista Gomes dos Santos^b, Marcelo Alves Ferreira^c, Ana Lucia Garippo^d, Roger Chammass^e, Elia Caldini^c, Irineu Tadeu Velasco^a, Heraldo Possolo de Souza^a, Marcel Cerqueira César Machado^a

^a Emergency Medicine Department, University of São Paulo, Brazil

^b Pathology Department, University of São Paulo, Brazil

^c Cell Biology Department, University of São Paulo, Brazil

^d PREMIUM Confocal Microscopy Core Facility, University of São Paulo, Brazil

^e Oncology Department, University of São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2012

Received in revised form 8 April 2013

Accepted 23 April 2013

Available online 4 June 2013

Keywords:

Antimicrobial peptides

Sepsis

Inflammation

ABSTRACT

LL-37 is the only cathelicidin produced by human cells. It is secreted by a variety of cell types, including monocyte/macrophages, neutrophils, mast cells, keratinocytes and epithelial cells, acting on the extracellular milieu by directly killing bacteria or boosting innate immunity. Here, we show that LL-37 translocates to the nucleus following overwhelming infection, putting in evidence that its role may be even broader, with new potential important implications to cell biology. Future studies are necessary to address if LL-37 is able to induce or affect transcription, since it can lead to a novel cell signaling pathway that probably will contribute to the understanding of complex diseases.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Antimicrobial peptides are small proteins with essential functions to the mammalian immune response, as well as many other organisms, participating primarily in innate immunity (Gallo et al., 2002; Nizet et al., 2001). Antimicrobial peptides have been implicated in a myriad of diseases, such as psoriasis, atopic dermatitis, sepsis, inflammatory bowel disease, infertility and cancer, being extensively studied for the development of new drugs (Pinheiro da Silva and Machado, 2012).

Cationic host defense peptides are gene encoded and expressed in a variety of cell types, including monocyte/macrophages, neutrophils, mast cells, keratinocytes and epithelial cells. LL-37 is constitutively expressed and inducible by microbial signature molecules, inflammation and tissue injury (Mookherjee and Hancock, 2007).

Myeloid cells express intracellular receptors that recognize viral and microbial nucleic acids and can be further activated by antimicrobial peptides (Latz et al., 2004; Diebold et al., 2004). LL-37 also activates other membrane receptors, such as P2X7, an ATP-activated ion channel expressed by lymphocytes, dendritic cells, macrophages/microglia and non-hematopoietic cells, such as

fibroblasts, leading to massive calcium entry and can probably even induce ion fluxes in a receptor-independent manner (Tomasinsig et al., 2008).

It has also been reported that LL-37 binds formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1), inducing chemotaxis and angiogenesis (Kurosaka et al., 2005; Koczulla et al., 2003), and transactivates the epidermal growth factor receptor stimulating keratinocytes proliferation (Tokumaru et al., 2005; Schaubert and Gallo, 2008). In the pulmonary epithelia, LL-37 induces nuclear translocation of NF- κ B and production of IL-6 (Pistolic et al., 2009) and in monocytes the activation of ERK and p38 (Bowdish et al., 2004). It has been reported, moreover, that self-DNA couples with LL-37 in autoimmune diseases like psoriasis, triggering pathological interferon production after engulfment in endosomal compartments mediated by direct binding to Toll-like receptor 9 (Lande et al., 2007). LL-37, thus, can form a complex with DNA and induce modifications in its tridimensional structure caused by electrostatic fields. Due to its DNA-binding properties, we hypothesized that LL-37 should migrate to the nucleus during inflammation. Defensins, moreover, have been found inside the nucleus in prokaryotic cells, as described in the discussion section.

2. Methods

Briefly, neutrophils from healthy individuals and septic patients were stained with anti-LL-37 antibody and DAPI and analyzed by

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3061 8480.

E-mail address: pinheirofabiano@hotmail.com (F. Pinheiro da Silva).

3. Results and discussion

There is convincing evidence recognizing alternative non-lytic modes of action by antimicrobial peptides, as described for apidaecidin (Casteels and Tempst, 1994), dermicidin (Steffen et al., 2006), histatin-5 (Mochon and Liu, 2008) and human defensins (Vylkova et al., 2007). In addition to electrostatic attraction, specific cell membrane components have shown to interact with peptides. Lipid II, for example, acts as a docking site to attract nisin to the bacterial membrane and promote cell permeation (Hsu et al., 2004;

Wiedemann et al., 2001). Mersacidin also binds Lipid II and inhibits bacterial growth with no cell permeation (Breukink and de Kruijff, 2006). In many situations, initial interaction seems to depend on cell surface complex glycans (Console et al., 2003). Phosphomannans increase the toxicity of the antifungal osmotin, probably by serving also as docking structures that facilitate the interaction and diffusion across the cell wall (Ibeas et al., 2000).

Most antimicrobial peptides bind nucleic acids (DNA and RNA) *in vitro* (Castle et al., 1999; Subbalakshmi and Sitaram, 1998; Boman et al., 1993), indicating that disruption of cell membranes might be combined with inhibition of DNA synthesis, transcription and/or RNA translation. Interestingly, *S. cerevisiae* proteins involved in DNA repair were purified as partners of dermaseptin S3, contributing to the understanding of its induction of apoptosis in yeast (Morton et al., 2007).

The pea defensin PSD1 was shown to locate inside the nucleus of the model fungus *Neurospora crassa*, wherein it might alter cell cycle progression (Lobo et al., 2007).

4. Conclusion

Here, for the first time, we show migration of LL-37 inside the nucleus of eukaryotic cells. LL-37 has been studied as an immunoregulatory molecule able to bind to numerous membrane receptors, as well as intracellular receptors, inducing cell signal (Fig. 2). The biological responses triggered by its nuclear migration warrant further studies, since it may have critical implications to cell biology. Chromatin immunoprecipitation techniques may reveal important information about antimicrobial peptides binding properties.

Acknowledgement

FPS is supported by FAPESP, Sao Paulo Research Foundation (grant #2009/17731-2).

References

- Boman, H.G., Agerberth, B., Boman, A., 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and P8-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immun.* 61 (7), 2978–2984, Epub 1993/07/01.
- Bowdish, D.M., Davidson, D.J., Speert, D.P., Hancock, R.E., 2004. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J. Immunol.* 172 (6), 3758–3765, Epub 2004/03/09.
- Breukink, E., de Kruijff, B., 2006. Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Rev. Drug Discovery* 5 (4), 321–332, Epub 2006/03/15.
- Casteels, P., Tempst, P., 1994. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-pore-forming mechanism involving stereospecificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1), 339–345, Epub 1994/02/28.
- Castle, M., Nazarian, A., Yi, S.S., Tempst, P., 1999. Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *J. Biol. Chem.* 274 (46), 32555–32564, Epub 1999/11/07.
- Console, S., Marty, C., Garcia-Echeverria, C., Schwendener, R., Ballmer-Hofer, K., 2003. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 278 (37), 35109–35114, Epub 2003/07/03.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C., 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303 (5663), 1529–1531, Epub 2004/02/21.

- Gallo, R.L., Murakami, M., Ohtake, T., Zaiou, M., 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110 (6), 823–831, Epub 2002/12/05.
- Hsu, S.T., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M.A., de Kruijff, B., Kaptein, R., et al., 2004. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (10), 963–967, Epub 2004/09/14.
- Ibeas, J.I., Lee, H., Damsz, B., Prasad, D.T., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., et al., 2000. Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 23 (3), 375–383, Epub 2000/08/06.
- Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krotz, F., Zahler, S., Gloe, T., et al., 2003. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* 111 (11), 1665–1672, Epub 2003/06/05.
- Kurosaka, K., Chen, Q., Yarovinsky, F., Oppenheim, J.J., Yang, D., 2005. Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. *J. Immunol.* 174 (10), 6257–6265, Epub 2005/05/10.
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.H., Homey, B., et al., 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449 (7162), 564–569, Epub 2007/09/18.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., et al., 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 5 (2), 190–198, Epub 2004/01/13.
- Lobo, D.S., Pereira, L.B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L.N., Cabral, L.M., Faria, J., et al., 2007. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* 46 (4), 987–996, Epub 2007/01/24.
- Mochon, A.B., Liu, H., 2008. The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption of the *Candida albicans* surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm. *PLoS Pathog.* 4 (10), e1000190, Epub 2008/11/01.
- Mookherjee, N., Hancock, R.E., 2007. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (7–8), 922–933, Epub 2007/02/21.
- Morton, C.O., Dos Santos, S.C., Coote, P., 2007. An amphibian-derived, cationic, alpha-helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death. *Mol. Microbiol.* 65 (2), 494–507, Epub 2007/06/26.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R.A., et al., 2001. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414 (6862), 454–457, Epub 2001/11/24.
- Pinheiro da Silva, F., Machado, M.C., 2012. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides* 36 (2), 308–314, Epub 2012/06/05.
- Pistolic, J., Cosseau, C., Li, Y., Yu, J.J., Filewod, N.C., Gellatly, S., et al., 2009. Host defence peptide LL-37 induces IL-6 expression in human bronchial epithelial cells by activation of the NF-kappaB signaling pathway. *J. Innate Immun.* 1 (3), 254–267, Epub 2009/01/01.
- Schauber, J., Gallo, R.L., 2008. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122 (2), 261–266, Epub 2008/04/29.
- Steffen, H., Rieg, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H.G., et al., 2006. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (8), 2608–2620, Epub 2006/07/28.
- Subbalakshmi, C., Sitaram, N., 1998. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* 160 (1), 91–96, Epub 1998/03/12.
- Tokumaru, S., Sayama, K., Shirakata, Y., Komatsu, A., Ouhara, K., Hanakawa, Y., et al., 2005. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J. Immunol.* 175 (7), 4662–4668, Epub 2005/09/24.
- Tomasinsig, L., Pizzirani, C., Skerlavaj, B., Pellegatti, P., Gulinelli, S., Tossi, A., et al., 2008. The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 283 (45), 30471–30481, Epub 2008/09/04.
- Vylkova, S., Nayyar, N., Li, W., Edgerton, M., 2007. Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (1), 154–161, Epub 2006/11/01.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., et al., 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* 276 (3), 1772–1779, Epub 2000/10/20.

Anexo C - Barbeiro DF et al. Cathelicidin LL-37 bloodstream surveillance is down regulated during septic shock. *Microbes Infect.* 2013 May;15(5):342-6.

Cathelicidin LL-37 bloodstream surveillance is down regulated during septic shock

Denise Frediani Barbeiro, Hermes Vieira Barbeiro, Fernando Godinho Zampieri, Marcel Cerqueira César Machado, Francisco Torggler Filho, Débora Maria Gomes Cunha, Alessandra Carvalho Goulart, Irineu Tadeu Velasco, Luiz Monteiro da Cruz Neto, Heraldo Possolo de Souza, Fabiano Pinheiro da Silva*

Emergency Medicine Department, University of São Paulo, Brazil

Received 25 September 2012; accepted 3 January 2013

Available online 14 January 2013

Abstract

Host defense peptides are ancient weapons of the innate immunity. The human cathelicidin LL-37 protects the epithelial barrier against infection and is constitutively secreted in the bloodstream by immune cells. Current knowledge claims that LL-37 is up regulated upon infection. LL-37 can protect against bacterial infections and possesses many immunomodulatory properties. Here, we show that the human host defense peptide LL-37 is down regulated during septic shock. Furthermore, we show that these effects are not related to vitamin D serum levels, a potent inducer of LL-37 gene expression, pointing out the complex regulation of cathelicidins during septic shock.

© 2013 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Cathelicidin; Sepsis; Vitamin D; Inflammation

1. Introduction

Cathelicidins are a major class of mammalian host defense peptides (HDPs) produced by leukocytes and on epithelial surfaces [1]. While some mammals express multiple cathelicidins, just a single member of this HDP family is found in humans or mice. Human cathelicidin (LL-37) and murine cathelicidin (CRAMP) closely resemble one another in size, architecture of encoding genes, proteolytic processing from inactive precursor to mature peptide, amphipathic α -helical structure, overall cationic charge, tissue and cellular distribution of expression, and spectrum and mechanism of antimicrobial activity. A study of bacterial skin infection in

CRAMP-deficient mice was the first to demonstrate an essential role for a HDP in mammalian innate immunity [2], and further investigations in this model have shown cathelicidin contributes to antibacterial defense of the gastrointestinal tract [3], urinary tract [4], and ocular mucosa [5].

Like many HDPs, the bactericidal activities of cathelicidins are related to their cationic nature, which promotes interaction with and destabilization of anionic bacterial cell walls and membranes [6]. LL-37 is present in leukocytes and epithelial cells of the skin, gastrointestinal tract, epididymis and lungs [4]. The rodent ortholog of human cathelicidin, CRAMP, has an identical expression pattern.

Despite their killing effects, increasing evidence points out that these molecules also have immunomodulatory properties, activating different cell types [7], inducing chemotaxis [8], participating in wound healing [9] and stimulating angiogenesis [10]. Mounting evidence indicates that cathelicidins boost oxidative burst [11], bind and neutralize lipopolysaccharide [12], modulate macrophage Toll-like receptor (TLR) responses

* Corresponding author. Faculdade de Medicina da USP, Laboratório de Emergências Clínicas (LIM/51), Av. Dr. Arnaldo, 455 sala 3189, CEP: 01246-903, São Paulo – SP, Brazil. Tel/fax: +55 11 3061 8480.

E-mail address: pinheirofabiano@hotmail.com (F. Pinheiro da Silva).

and cytokine release [13], and activate mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascades [14].

Most of the studies regarding the effects of cathelicidins during infection, however, focused on models of local infection, investigating either mucosal or skin immunity. Here, we focus on the neutrophil production of LL-37 during septic shock and how it correlates with the vitamin D and TNF α pathways, since the former induces potent LL-37 transcription and the latter directs NF κ B activation.

2. Material and methods

2.1. Study design

The current study was a prospective cohort, conducted in one of the Hospital das Clínicas Intensive Care Units (University of São Paulo, Brazil), and conceived as part of the BRISK Project (Brazilian Initiative for Sepsis Knowledge), launched in 2009 to investigate many molecular aspects of sepsis. Surgical patients, trauma and coronary syndromes are usually admitted at other ICUs from our hospital, what makes our population very homogeneous. Indeed, the five following reasons account for more than 90% of the ICU admissions included in this study: sepsis, stroke, altered level of consciousness, pulmonary edema and asthma/COPD. Patients less than 18 years old, pregnant, with disseminated malignancies or receiving chemotherapy, HIV-positive, advanced hepatic disease, in end-of-life conditions and those that refused to participate in this study were excluded. The remaining patients were divided in four groups: 1) ICU control (patients admitted to the ICU for non-infectious causes); 2) severe sepsis group (patients admitted to the ICU for severe sepsis or developed severe sepsis during the ICU stay); 3) septic shock group (patients admitted to the ICU for septic shock or developed septic shock during the ICU stay); 4) recovery phase group (patients that survive septic shock, remaining 48 h without vasopressors or hemodynamic instability and presenting clinical and laboratory improvement of the infection as judged by members of the medical staff not participating in the investigation). Data and blood samples were collected at patient's admission or when severe sepsis and septic shock were diagnosed by the medical staff. Every patient enrolled in the recovery phase comes from the septic shock group. The remaining groups are independent. Severe sepsis and septic shock were defined, according to the *ACCP/SCCM Consensus Conference Committee* proposed in 1992 [15]. The protocol was approved by Hospital das Clínicas Ethical Committee and patients (or their close relatives) received detailed explanations and provided written consent to be included in the study protocol.

2.2. LL-37, VDR and TNF α real-time PCR

Human neutrophils were separated from the peripheral blood of patients by density gradient centrifugation with Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio Sciences, Uppsala, Sweden). Gene expression was determined by reverse transcriptase PCR

(RT-PCR) analysis using the HPRT-1 gene as a housekeeping gene. Total RNA was isolated from neutrophils according to a standard Trizol RNA isolation protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Samples of total RNA were quantified by measuring the optical density at 260 nm (NanoVue Plus-spectrophotometer GE, New Jersey, USA). All RT-PCR reaction mixtures were prepared using Superscript Platinum III one step kits with incorporated SYBR Green (Invitrogen, # 11736-051). One step cDNA production and DNA amplification was performed on a Step One (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA) thermocycler and products were confirmed on a 1.5% agarose gel. The primers used were as follows: LL-37 sense: 5'-GCTAACCTC-TACCGCTCCT-3'; reverse: 5'-GGGTCACGTGTCCCATACAC-3'; VDR sense: 5'-GCCCACCATAAGACCTACGA-3'; reverse: 5'-AGATTGGAGAAGCTGGACGA-3' and TNF α sense: 5'-TCCTTCAGACACCCTCAACC-3'; reverse: 5'-AGGCCCCAGTTTGAATTCTT-3'. Reverse transcription was carried out at 45 °C for 30 min, 95 °C for 5 min, and 5 °C for 5 min. After reverse transcription, PCR was done using the following condition: 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min for 35 cycles.

2.3. LL-37, TNF α and vitamin D measurements

LL-37 protein levels were measured in the plasma, using an ELISA kit (MyBIOsource), according to instructions provided in the manual. TNF α was measured by multiplex technique (Genex diagnostics), using MAGPIX technology, and vitamin D measurements were obtained by radioimmunoassay at the Hospital das Clínicas Central Laboratory.

2.4. Statistical analysis

A descriptive analysis of the population (age, sex, electrolytes, hemogram, SOFA score and case-fatality) was performed. Continuous variables were analyzed by using Student's *t* test or analysis of variance (ANOVA), as appropriate. Post hoc analysis was performed using LSD test. Categorical variables were analyzed by using chi-square test. Results were reported as mean $\pm$ standard deviation. All analyses were performed using SPSS 19.0 software. A *p* value $\leq$ 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

We included 183 patients in this study protocol (23 healthy individuals, 69 patients admitted in the ICU for non-infectious reasons, 28 in severe sepsis, 46 admitted for septic shock and 17 in the recovery phase) between October 2010 and August 2012. Patients in all groups had similar age and sex distribution. Admission SOFA score and case-fatality were higher for patients in septic shock compared to the other groups. C-reactive protein (CRP), electrolytes and hemogram values were analyzed in order to assess patient's clinical profile (Table 1). Hemoglobin levels decreased during sepsis evolution, while CRP and the number of polymorphonuclear cells

Table 1
Population characteristics of the study groups, according to age, sex, clinical variables, severity and case-fatality.

Population characteristics						
	Healthy (n = 23)	ICU control (n = 69)	Severe sepsis (n = 28)	Septic shock (n = 46)	Recovery phase (n = 17)	Significance P
<i>Age and sex distribution</i>						
Age (yrs)	43 ± 8	50 ± 15	49 ± 19	52 ± 19	51 ± 20	0.354
Male sex	5 (41.7%)	26 (40.6%)	15 (62.5%)	19 (44.2%)	8 (57.1%)	0.339
<i>Clinical variables</i>						
Urea (mg/dl)	30 ± 20	66 ± 61	76 ± 57	77 ± 69	72 ± 35	0.800
Creatinine (mg/dl)	0.8 ± 0.4	2.13 ± 2.95	2.23 ± 2.67	2.41 ± 2.30	1.84 ± 1.34	0.958
Sodium (mEq/L)	140 ± 5	142 ± 9	137 ± 6	140 ± 11	142 ± 6	0.159
Potassium (mEq/L)	4.3 ± 0.8	4.0 ± 0.8	4.3 ± 0.9	4.2 ± 1.0	3.5 ± 0.5	0.072
Magnesium (mg/dL)	2.1 ± 0.5	2.0 ± 0.4	2.0 ± 0.4	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.2	0.292
Ionized calcium (mg/dL)	4.95 ± 0.35	4.6 ± 0.6	4.3 ± 0.8	4.3 ± 0.5	4.2 ± 1.1	0.072
Phosphate (mEq/L)	3.6 ± 0.9	3.6 ± 1.6	3.7 ± 1.2	4.4 ± 2.4	3.7 ± 1.0	0.249
Chloride (mEq/L)	103 ± 4	106 ± 10	102 ± 6	105 ± 7	107 ± 5	0.258
Hb (g/dL)	14 ± 2	11.6 ± 2.8	10.5 ± 2.9	10.1 ± 2.1	9.0 ± 1.7	0.001
Leucocytes (/mm ³)	7.500 ± 3.500	11.835 ± 9.273	14.936 ± 9.447	15.387 ± 12.220	10.384 ± 6.460	0.164
Polymorphonuclear cells (/mm ³)	4.300 ± 2.600	9.059 ± 3.930	13.465 ± 8.669	11.774 ± 9.727	8.789 ± 5.368	0.037
Platelets (/mm ³)	295.000 ± 155.000	220.568 ± 118.166	183.227 ± 91.913	204.756 ± 159.326	180.529 ± 136.914	0.670
C-reactive protein (mg/dl)	< 5	54 ± 83	96 ± 101	132 ± 132	89 ± 100	0.004
<i>Severity and case-fatality</i>						
SOFA score	—	3.75 ± 3.18	4.12 ± 2.19	9.08 ± 3.83	3.80 ± 3.14	<0.001
ICU case-fatality	—	8 (12.5%)	1 (n = 4.2%)	14 (n = 35%)	0 (0%)	<0.001

peaked during severe sepsis. The remaining clinical variables did not show significant differences among the study groups.

LL-37 gene expression increased by two-fold when patients in the ICU control group were compared to those in severe sepsis ($p = 0.050$), returned to basal levels when patients in severe sepsis were compared with the septic shock group ($p = 0.031$) and doubled again, when patients in the septic

shock group were compared to those in the recovery phase ($p = 0.009$). Patients in the recovery phase, thus, exhibited a two-fold higher levels of LL-37 mRNA compared to healthy individuals (Fig. 1A). No difference, however, could be detected in LL-37 plasma levels showing that there is no correlation between expression of the CAMP gene in neutrophils and circulating levels of LL-37 (Fig. 1D).

Fig. 1. LL-37, VDR and TNF α expression levels are shown on the top (A, B and C). Protein levels are shown on the bottom (D, E and F). Dashed horizontal line in Fig. 1E represents the minimum vitamin D normal level for the human population.

In order to investigate any correlation between LL-37 and vitamin D activity, we measured the vitamin D receptor (VDR) gene expression and vitamin D plasma values. We could not detect any difference in VDR gene expression ($p = 0.959$) or vitamin D plasma values ($p = 0.175$) when performing univariate analysis of the study groups (Fig. 1B and E).

TNF α protein levels rose 5-fold during septic shock, when compared to ICU controls, going in the opposite direction as neutrophils LL-37 gene expression (Fig. 1F). Analyzing neutrophils TNF α gene expression specifically, we found a 50% increase during septic shock ($p = 0.035$; Fig. 1C).

4. Discussion

The human cathelicidin LL-37 is constitutively produced in the bloodstream and functions as an alarmin, amplifying Toll-like receptors signaling [16–18]. LL-37 expression increases following infections and inflammation, and LL-37 has been shown to provide protection against infections [19]. Knowledge about pathways that down regulate its expression, however, are still lacking in the literature. It has been described that cathelicidin is protective against septic shock in murine [20] and rat [21] models of sepsis, but discrepant results between animal models and human septic shock are frequently observed. We have found no differences in mortality, when wild-type and CRAMP-deficient mice were challenged with a lethal dose of LPS [22]. In our point of view, during overwhelming infection the administration of cathelicidins might be deleterious, since they are cytotoxic, even though further research is warranted to answer that question. Interestingly, Berkestedt et al. found that plasma levels of LL-37 were unchanged between sepsis patients and controls, while levels of other HDPs (alpha-defensins and lactoferrin) were increased in sepsis patients [23].

Receptor-independent intracellular signaling has been recently described, due to cell membrane lipid sorting and syk kinase activation in dendritic cells [24]. Formation of pores by LL-37 on the mammalian cell membrane [25] and induction of ion fluxes, probably potentiates TLRs activation and subsequent p38 and IKB α phosphorylation.

We present results that demonstrate downregulation of LL-37 activity during overwhelming infection. Some reports state that LL-37 induces stimulation of MAPKs in human peripheral blood-derived monocytes [14]. Others have described cathelicidins as modulators of the TLR-mediated inflammatory response, inhibiting both cytokine release and MAPKs activation secondary to TLRs stimulation [13,26]. The mechanism is complex, because LL-37 is an immunomodulatory peptide that exhibits both pro- and anti-inflammatory properties based on the environmental conditions, controls infections by modulating host immune responses, and LL-37 expression is found to be dysregulated in various chronic inflammatory conditions. Considering endogenous production of cathelicidin in circulating leukocytes, increased NF- κ B and p38 MAPK signaling triggers pro-inflammatory cytokine release, and in the setting of a severe systemic infection, it may further precipitate the sepsis cascade. The direct killing effects of LL-37, moreover, has been

shown to be significantly reduced under physiological host mucosal environment [27]. Thus, we hypothesize that cathelicidin downregulation may be a protective mechanism to avoid further inflammatory systemic response.

Jeng et al. found that both plasma levels of vitamin D and LL-37 were decreased in sepsis patients [28]. They did not measure LL-37 gene expression, however, at the recovery phase of septic shock. Our results put in evidence that hypovitaminosis D, despite ubiquitous in our ICU population, is not the only responsible for the decrease in LL-37 gene expression during septic shock, since LL-37 is up regulated in the recovery phase, while hypovitaminosis D lasts. It is important to remember that since neutrophils do not produce vitamin D, they depend on systemic vitamin D levels to trigger VDR transcription. Other pathways, however, may be critical for the decrease in LL-37 gene expression during septic shock, as well as for its up regulation in the recovery phase. We hypothesize that the rise in LL-37 gene expression in the recovery phase of septic shock may play an important role in tissue repair [29]. Many factors, furthermore, may account for the discrepancy between LL-37 protein and RNA levels found in our study, such as maturation of the LL-37 precursor, regulation of LL-37 synthesis and secretion or deregulation of proteases activity during septic shock.

Sepsis remains the leading cause of death in critically ill patients in developed countries. Despite the sustained efforts, mortality remains unchanged. Manipulation of the immune response is an attractive and frequent topic of discussion among specialists, since the rapid emergence of resistance to antibiotic drugs and the potential risks of secondary infection due to invasive treatment devices, such as plasmapheresis, mechanical ventilation and renal replacement therapy, ask for more effective alternatives.

Host defense peptides are strong candidates, since they act both enhancing the immune response and through their microbicidal properties [29,30]. Accumulating evidence, however, points out the major role played by the explosive inflammatory response as the major culprit for death during systemic infections.

Cathelicidin administration has been touted as a potential sepsis therapy based on its LPS-neutralizing properties and direct antimicrobial activities [31]. In our opinion, however, host defense peptides may be deleterious in septic shock. Since LPS and flagellin-mediated inflammatory responses are potentiated by cathelicidin [22], we believe that LL-37 administration may further exacerbate the systemic inflammatory response.

Further research is warranted on this puzzling topic to provide further knowledge on the complex mechanisms developed by HDPs to participate in such a myriad of cellular processes, modulating host defense.

Acknowledgments

The authors have no financial or ethical conflicts of interest. The current study is part of an ongoing prospective cohort study, designed to store clinical data and biological samples

for multiple projects and conceived by HPS and LMCN (Brazilian Initiative for Sepsis Knowledge, BRISK Project). FPS is supported by FAPESP, São Paulo Research Foundation (grant # 2009/17731-2). ITV is supported by CNPq, National Council for Scientific and Technological Development (grant # 480109/2010-9). We would like to express our gratitude to the patients and their families for consenting to participate in this study.

References

- [1] F. Pinheiro da Silva, M.C. Machado, Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications, *Peptides* 36 (2012) 308–314.
- [2] V. Nizet, T. Ohtake, X. Lauth, J. Trowbridge, J. Rudisill, R.A. Dorschner, V. Pestonjans, J. Piraino, K. Huttner, R.L. Gallo, Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection, *Nature* 414 (2001) 454–457.
- [3] M. Imura, R.L. Gallo, K. Hase, Y. Miyamoto, L. Eckmann, M.F. Kagnoff, Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens, *J. Immunol.* 174 (2005) 4901–4907.
- [4] M. Chromek, Z. Slanova, P. Bergman, L. Kovacs, L. Podracka, I. Ehren, T. Holdfelt, G.H. Gudmundsson, R.L. Gallo, B. Agerberth, A. Brauner, The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection, *Nat. Med.* 12 (2006) 636–641.
- [5] L.C. Huang, D. Jean, R.J. Prose, R.Y. Reins, A.M. McDermott, Ocular surface expression and in vitro activity of antimicrobial peptides, *Curr. Eye Res.* 32 (2007) 595–609.
- [6] Z. Oren, J.C. Lerman, G.H. Gudmundsson, B. Agerberth, Y. Shai, Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity, *Biochem. J.* 341 (Pt 3) (1999) 501–513.
- [7] M.G. Scott, D.J. Davidson, M.R. Gold, D. Bowdish, R.E. Hancock, The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses, *J. Immunol.* 169 (2002) 3883–3891.
- [8] K. Kurosaka, Q. Chen, F. Yarovsky, J.J. Oppenheim, D. Yang, Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemottracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant, *J. Immunol.* 174 (2005) 6257–6265.
- [9] R.A. Dorschner, V.K. Pestonjans, S. Tamakawa, T. Ohtake, J. Rudisill, V. Nizet, B. Agerberth, G.H. Gudmundsson, R.L. Gallo, Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*, *J. Invest. Dermatol.* 117 (2001) 91–97.
- [10] R. Koczulla, G. von Degenfeld, C. Kupatt, F. Krotz, S. Zahler, T. Gloe, K. Isbrucker, P. Unterberger, M. Zaiou, C. Leberer, A. Karl, P. Raake, A. Plosser, P. Boekstegers, U. Welsch, P.S. Hiemstra, C. Vogelmeier, R.L. Gallo, M. Chaus, R. Bals, An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1665–1672.
- [11] Y. Zheng, F. Niyonsaba, H. Ushio, I. Nagaoka, S. Ikeda, K. Okumura, H. Ogawa, Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils, *Br. J. Dermatol.* 157 (2007) 1124–1131.
- [12] A. Scott, S. Weldon, P.J. Buchanan, B. Schock, R.K. Ernst, D.F. McAuley, M.M. Turney, C.R. Irwin, J.S. Elborn, C.C. Taggart, Evaluation of the ability of LL-37 to neutralise LPS in vitro and ex vivo, *PLoS One* 6 (2011) e26525.
- [13] N. Mookherjee, K.L. Brown, D.M. Bowdish, S. Doria, R. Falsafi, K. Hokamp, F.M. Roche, R. Ma, G.H. Deho, J. Pistolic, J.P. Powers, J. Bryan, F.S. Brinkman, R.E. Hancock, Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37, *J. Immunol.* 176 (2006) 2455–2464.
- [14] D.M. Bowdish, D.J. Davidson, D.P. Speert, R.E. Hancock, The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes, *J. Immunol.* 172 (2004) 3758–3765.
- [15] R.C. Bone, R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Kraus, R.M. Schein, W.J. Sibbald, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis, in: The ACCP/SCCM consensus conference committee, American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, *Chest* 101, 1992, pp. 1644–1655.
- [16] P.T. Liu, S. Stenger, H. Li, L. Wenzel, B.H. Tan, S.R. Krutzik, M.T. Ochoa, J. Schaubert, K. Wu, C. Meinken, D.L. Kamen, M. Wagner, R. Bals, A. Steinmeyer, U. Zugel, R.L. Gallo, D. Eisenberg, M. Hewison, B.W. Hollis, J.S. Adams, B.R. Bloom, R.L. Modlin, Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response, *Science* 311 (2006) 1770–1773.
- [17] J.J. Oppenheim, P. Tewary, G. de la Rosa, D. Yang, Alarmins initiate host defense, *Adv. Exp. Med. Biol.* 601 (2007) 185–194.
- [18] J.J. Oppenheim, D. Yang, Alarmins: chemotactic activators of immune responses, *Curr. Opin. Immunol.* 17 (2005) 359–365.
- [19] J. Schaubert, R.A. Dorschner, K. Yamasaki, B. Brouha, R.L. Gallo, Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli, *Immunology* 118 (2006) 509–519.
- [20] R. Bals, D.J. Weiner, A.D. Mosconi, R.L. Meegalla, J.M. Wilson, Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide, *Infect. Immun.* 67 (1999) 6084–6089.
- [21] O. Cirioni, A. Giacometti, R. Ghiselli, C. Bergnach, F. Orlando, C. Silvestri, F. Mucchiani, A. Licci, B. Skerlavaj, M. Rocchi, V. Saha, M. Zanetti, G. Scalise, LL-37 protects rats against lethal sepsis caused by gram-negative bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006) 1672–1679.
- [22] F. Pinheiro da Silva, R.L. Gallo, V. Nizet, Differing effects of exogenous or endogenous cathelicidin on macrophage toll-like receptor signaling, *Immunol. Cell. Biol.* 87 (2009) 496–500.
- [23] I. Berkestäd, H. Herwald, L. Ljunggren, A. Nelson, M. Bodelsson, Elevated plasma levels of antimicrobial polypeptides in patients with severe sepsis, *J. Innate Immun.* 2 (2010) 478–482.
- [24] G. Ng, K. Sharma, S.M. Ward, M.D. Desrosiers, L.A. Stephens, W.M. Schoel, T. Li, C.A. Lowell, C.C. Ling, M.W. Amrein, Y. Shi, Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells, *Immunity* 29 (2008) 807–818.
- [25] C.C. Lee, Y. Sun, S. Qian, H.W. Huang, Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37, *Biophys. J.* 100 (2011) 1688–1696.
- [26] K.L. Brown, G.F. Poon, D. Birkenhead, O.M. Pena, R. Falsafi, C. Dahlgren, A. Karlsson, J. Bylund, R.E. Hancock, P. Johnson, Host defense peptide LL-37 selectively reduces proinflammatory macrophage responses, *J. Immunol.* 186 (2011) 5497–5505.
- [27] D.M. Bowdish, D.J. Davidson, R.E. Hancock, A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity, *Curr. Protein Pept. Sci.* 6 (2005) 35–51.
- [28] L. Jeng, A.V. Yamschikov, S.E. Judd, H.M. Blumberg, G.S. Martin, T.R. Ziegler, V. Tangpricha, Alterations in vitamin D status and antimicrobial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis, *J. Transl. Med.* 7 (2009) 28.
- [29] M. Carretero, M.J. Escamez, M. Garcis, B. Duarte, A. Holguin, L. Retamosa, J.L. Jorcano, M.D. Rio, F. Larcher, In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 223–236.
- [30] R.E. Hancock, A. Nijnik, D.J. Philpott, Modulating immunity as a therapy for bacterial infections, *Nat. Rev. Microbiol.* 10 (2012) 243–254.
- [31] N. Mookherjee, L.M. Rehaume, R.E. Hancock, Cathelicidins and functional analogues as antiseptic molecules, *Expert Opin. Ther. Targets* 11 (2007) 993–1004.

Anexo D - Pinheiro da Silva F et al. Septic shock in older people: a prospective cohort study. *Immun Ageing*. 2013 Jun 6;10(1):21.

Pinheiro da Silva et al. *Immunity & Ageing* 2013, **10**:21
http://www.immunologyageing.com/content/10/1/21

RESEARCH

Open Access

Septic shock in older people: a prospective cohort study

Fabiano Pinheiro da Silva*, Fernando Godinho Zampieri, Denise Frediani Barbeiro, Hermes Vieira Barbeiro, Alessandra Carvalho Goulart, Francisco Torggler Filho, Irineu Tadeu Velasco, Luiz Monteiro da Cruz Neto, Heraldo Possolo de Souza and Marcel Cerqueira César Machado

Abstract

Background: Septic shock is the first cause of death in Intensive Care Units. Despite experimental data showing increased inflammatory response of aged animals following infection, the current accepted hypothesis claims that aged patients are immunocompromised, when compared to young individuals.

Results: Here, we describe a prospective cohort study designed to analyze the immune profile of this population.

Conclusion: Older people are as immunocompetent as the young individual, regarding the cytokines, chemokines and growth factors response to devastating infection.

Keywords: Ageing, Sepsis, Inflammation

Background

Ageing is a growing field of medical research, since this process is strongly related with diseases such as atherosclerosis, Alzheimer's Disease, type 2 diabetes and other main causes of death worldwide. Older age is associated with chronically elevated circulating levels of inflammatory markers, such as tumor necrosis factor (TNF α), IL-1 β , IL-6 and C-reactive protein (CRP) [1]. Immunosenescence seems to influence many components of the immune system. Profound changes in T cell function have been described in older individuals [2,3], especially in Th17 and regulatory T cells activity [2,4]. Regarding innate immunity, age-associated alterations have been described in macrophages, natural-killer and polymorphonuclear cells [5,6]. Discrepant results, however, are frequently observed [7]. While some authors have detected an increase in cytokine production [8], for example, others have described opposing results [9].

Sepsis is a disease of older people. Indeed, 60% of all sepsis events and 80% of septic deaths occur in individuals over 65 years-old [10]. The incidence increases exponentially with age and older age is an independent risk factor for mortality among adults hospitalized with sepsis [11]. A recent prospective cohort study of patients

hospitalized with pneumonia-induced sepsis found an age-related increase in in-hospital, 90-day and 1-year post-discharge mortality [12].

The reason for the higher susceptibility to infection and the higher risk of severe sepsis and mortality in older adults, however, remain unclear [13]. Here, we investigate the cytokine profile of aged individuals compared to young adults, during the development of overwhelming infection, in order to characterize the immune status of this population.

Results

We included 73 patients in this study protocol (44 patients admitted in the ICU for non-infectious reasons and 29 admitted for septic shock) between October 2010 and October 2012. In our study, patients in the ICU control and septic shock groups showed similar profile when young and aged patients were compared. Sex distribution was similar in both groups. Regarding the population characteristics (Table 1), elderly patients in the septic shock group showed worst renal function than young patients in the same group ($p = 0.017$), as assessed by creatinin plasma levels. Both young and aged patients showed similar sodium, potassium, magnesium, phosphate and chloride plasma levels, whether in the ICU or septic shock group. Calcium, a marker of

* Correspondence: pinheirofabiano@hotmail.com
Emergency Medicine Department, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

© 2013 Pinheiro da Silva et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1 Population characteristics

	Young			Elderly			Group A vs. B p-value
	Control n=36	Septic shock (group A) n=21	p-value	Control n=8	Septic shock (group B) n=8	p-value	
age (yrs)	45 ± 11	40 ± 13	0.154	73 ± 6	75 ± 9	0.666	0.000
male sex	38%	50	0.454	50	62%	0.766	
creatinin (mg/dl)	1.50 ± 2.73	1.04 ± 1.24	0.523	1.50 ± 1.60	2.62 ± 1.40	0.173	0.017
sodium (meq/dl)	142 ± 11	139 ± 9	0.133	141 ± 6	146 ± 18	0.454	0.283
potassium (meq/dl)	3.52 ± 0.84	3.52 ± 1.16	0.988	3.62 ± 0.74	4.25 ± 0.70	0.122	0.055
magnesium (mg/dl)	1.44 ± 0.55	1.19 ± 0.51	0.147	1.38 ± 0.51	1.63 ± 0.51	0.302	0.064
calcium (mg/dl)	4.77 ± 0.86	4.42 ± 0.74	0.100	4.75 ± 0.46	4.12 ± 0.64	0.043	0.294
phosphate (mg/dl)	3.03 ± 1.15	3.86 ± 2.47	0.073	3.75 ± 1.66	4.38 ± 1.92	0.482	0.577
chloride (mg/dl)	107 ± 12	105 ± 7	0.527	108 ± 10	104 ± 6	0.394	0.703
hemoglobin (g/dl)	12 ± 2.0	10 ± 2.2	0.011	10 ± 2.0	10 ± 2.2	0.913	0.939
hematocrit (g/dl)	36 ± 6	30 ± 6	0.010	31 ± 6	32 ± 6	1.000	0.769
leucocytes (/mm ³)	10891 ± 4386	15569 ± 13341	0.046	17830 ± 23033	11863 ± 6020	0.499	0.314
PMN cells (/mm ³)	8778 ± 4003	12406 ± 10710	0.061	7518 ± 3917	10446 ± 5632	0.231	0.529
platelets (/mm ³)	235833 ± 136039	224571 ± 171250	0.769	196500 ± 86663	152750 ± 69134	0.267	0.119
albumin (g/dl)	2.83 ± 0.81	2.04 ± 0.74	0.000	2.62 ± 0.51	2.12 ± 0.35	0.039	0.708
lactate (g/dl)	12.75 ± 6.83	31.61 ± 35.91	0.001	11.25 ± 4.71	19.12 ± 9.32	0.311	0.154
CRP (g/dl)	50 ± 76	139 ± 129	0.003	56 ± 73	96 ± 162	0.494	0.939
SOFA score	3.50 ± 3.12	9.14 ± 4.13	0.000	4.13 ± 3.22	9.25 ± 2.96	0.002	0.517
ICU mortality	11%	47%	0.003	37.5%	50%	0.628	0.939

severity of disease [14], was significantly lower in aged septic individuals than in aged controls ($p = 0.043$), but not than in young septic patients ($p = 0.294$). Hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht) levels significantly decreased in young septic patients compared to controls, but not in aged patients. Leukocytes and polymorphonuclear cells (PMNs) significantly rose in young septic group compared to controls, but not in the elderly group. Platelets levels were similar in all study groups. Albumin significantly decreased in septic shock when compared to ICU controls, but young and aged patients showed similar albumin levels ($p = 0.708$). Lactate significantly rose in young, but not in the elderly, when patients in septic shock were compared to controls. The same profile was found for C-reactive protein levels. SOFA score and mortality were similar for the young and the older age septic groups ($p = 0.517$ and 0.986).

Cytokines profile showed activation of innate immunity and polyclonal activation of T cells in the young during septic shock, characterized by a rise in TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-17 and interferon- γ when compared to the ICU control group. No differences, however, could be detected when the young in septic shock (group A) was compared to the elderly in septic shock (group B) (Table 2). Chemokines and growth factors also showed

similar values when the elderly was compared to young subjects (Table 3).

Discussion

Older age has been widely characterized as a pro-inflammatory state [15]. Animal models of infection also support that older subjects have higher circulating levels of inflammatory markers. Tateda et al. have shown that aged mice exhibit higher TNF α , IL-1 β and IL-6 levels than young mice after intraperitoneal injection of LPS [16]. Using the cecal ligation and puncture model (CLP), Turnbull et al. also found similar results [17]. The underlying mechanism of the vulnerability to infections of the elderly has been ascribed to the breakdown of anatomic barriers, underlying illnesses or the declining capacity of the immune system [18], while latent infections such as cytomegalovirus (CMV) may act as chronic stimuli of the inflammatory system [19,20]. Persistent inflammation has been shown to increase the risk of bacterial invasion in rodents by reducing neutrophil recruitment and bacterial clearance [21,22]. Turnbull et al. proposed that macrophages of aged mice may be relatively activated, or primed, for cytokine production prior to LPS challenge. There have been, however, several conflicting reports, when in vitro production of cytokines by aged cells is

Table 2 Cytokines profile

	Young			Elderly			Group A vs. B
	Control n=36	Septic shock (group A) n=21	p-value	Control n=8	Septic shock (group B) n=8	p-value	p-value
<i>IL-1a</i>	31 ± 42	100 ± 82	0.000	27 ± 27	75 ± 82	0.270	0.242
<i>IL-1B</i>	2.50 ± 2.93	7.09 ± 7.11	0.007	1.12 ± 1.35	4.37 ± 6.98	0.480	0.148
<i>IL-1 RA</i>	36 ± 47	192 ± 295	0.001	31 ± 33	145 ± 292	0.114	0.317
<i>IL-2</i>	9.00 ± 6.74	13 ± 10	0.121	4.12 ± 2.10	9.62 ± 5.52	0.023	0.508
<i>IL-3</i>	2.08 ± 2.44	2.61 ± 3.33	0.849	0.62 ± 0.51	2.25 ± 2.54	0.070	0.899
<i>IL-4</i>	8.55 ± 10.60	32 ± 48	0.007	3.87 ± 4.91	16.00 ± 22.35	0.093	0.334
<i>IL-5</i>	2.19 ± 3.24	7.19 ± 9.26	0.010	0.50 ± 1.06	2.87 ± 3.44	0.082	0.208
<i>IL-6</i>	37 ± 63	1641 ± 3195	0.000	32 ± 39	1666 ± 3590	0.036	0.884
<i>IL-7</i>	11 ± 8.26	40 ± 39	0.000	5.62 ± 3.46	34.75 ± 48.70	0.002	0.393
<i>IL-8</i>	29 ± 25	806 ± 2819	0.000	26.25 ± 22.24	1695 ± 4602	0.016	0.354
<i>IL-9</i>	2.08 ± 2.37	4.52 ± 5.06	0.044	0.50 ± 1.06	4.25 ± 6.11	0.043	0.489
<i>IL-10</i>	12 ± 16	626 ± 2195	0.000	38 ± 78	480 ± 1079	0.012	0.575
<i>IL-12p40</i>	39 ± 44	111 ± 80	0.000	31 ± 34	141 ± 214	0.206	0.464
<i>IL-12p70</i>	7.19 ± 4.79	20.61 ± 20.09	0.002	4.50 ± 2.72	10.50 ± 8.79	0.423	0.195
<i>IL-13</i>	4.86 ± 6.51	14.90 ± 32.48	0.119	1.37 ± 1.06	10.87 ± 16.12	0.097	0.583
<i>IL-15</i>	7.38 ± 6.23	20.52 ± 25.30	0.001	4.00 ± 3.20	16.62 ± 18.92	0.011	0.558
<i>IL-17</i>	2.88 ± 2.43	8.66 ± 6.31	0.000	1.87 ± 1.45	6.87 ± 5.46	0.018	0.493
<i>IFNα</i>	67 ± 42	110 ± 58	0.000	195 ± 402	78 ± 38	0.270	0.150
<i>IFNγ</i>	7.83 ± 4.45	40.09 ± 52.41	0.000	6.25 ± 5.67	30.87 ± 36.56	0.013	0.574
<i>TFNα</i>	19 ± 21	111 ± 207	0.000	23 ± 20	81 ± 102	0.016	0.770

investigated [23-26]. In our study, we were also unable to find any cytokine, chemokine or growth factor that could serve to better explain the reasons why this population shows increased susceptibility and mortality to septic shock. Our results show, moreover, that leukocytosis, CRP and lactate are good markers of infection to young

patients, but not to the aged one. We suggest that the increased mortality of the elderly described by others may underlie on the function of non-immune cells. Disruption of epithelial barriers, malfunction of ciliary cells, malabsorption, malnutrition, polymorphisms, deficits of cognition and associated comorbidities, in our opinion, may

Table 3 Chemokines and growth factors profile

	Young			Elderly			Group A vs. B
	Control n=36	Septic shock (group A) n=21	p-value	Control n=8	Septic shock (group B) n=8	p-value	p-value
<i>EGF</i>	266 ± 212	212 ± 182	0.264	192 ± 80	250 ± 213	0.600	0.696
<i>FGF2</i>	122 ± 62	133 ± 55	0.301	113 ± 45	153 ± 67	0.344	0.575
<i>FTL3</i>	6.27 ± 11.4	18 ± 165	0.000	6.25 ± 14.04	16 ± 27	0.235	0.104
<i>FRAKTALINE</i>	167 ± 81	573 ± 858	0.001	120 ± 73	296 ± 273	0.027	0.251
<i>GCSF</i>	156 ± 196	3662 ± 7100	0.001	104 ± 106	3226 ± 7166	0.093	0.922
<i>GMCSF</i>	32 ± 21	125 ± 284	0.000	48 ± 65	54 ± 43	0.208	0.241
<i>GRO</i>	1958 ± 1642	2644 ± 3934	0.772	1733 ± 884	4074 ± 4718	0.753	0.435
<i>MCP-1</i>	610 ± 912	2806 ± 4334	0.002	916 ± 1129	3237 ± 4792	0.171	1.0
<i>MCP-3</i>	24 ± 13	58 ± 44	0.001	11.62 ± 5.20	32 ± 25	0.023	0.130
<i>MDC</i>	817 ± 719	714 ± 471	0.869	745 ± 350	625 ± 265	0.208	0.527
<i>MIP-1</i>	23 ± 22	50 ± 65	0.069	32.2 ± 871	39 ± 25	0.127	0.696
<i>MIP-1</i>	42 ± 25	102 ± 83	0.000	35 ± 31	94 ± 60	0.027	0.678
<i>VEGF</i>	227 ± 306	310 ± 239	0.003	143 ± 115	392 ± 387	0.021	0.678

play a pivotal role. Interestingly, impaired sympathetic response has been observed as a partial explanation for several modifications that occur during ageing [27], including increased mortality in septic shock [28].

Sepsis has challenged the medical community for decades. After the negative results of innumerable clinical trials, when researchers insisted that the disease could be controlled by inhibition of the pro-inflammatory response, a new hypothesis emerged. In 1996, Roger Bone proposed that early after the explosive inflammatory response that characterizes sepsis, a compensatory antagonistic response syndrome (CARS) would arise [29], explaining why anti-inflammatory drugs do not benefit septic patients and even further increase mortality. It is important to state that our study looks at the immune profile at one point in time. It is possible that immune profiles diverge later in disease. This point is important later when we talk about CARS, since CARS may still exist later in the disease course.

Actually, sepsis is considered a heterogenic disease, being very difficult to reproduce in animal models. Indeed, at the present time most of the researchers believe that a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) prevails in young patients, while CARS dominates most of the septic inflammatory response of older people. In aged patients, thus, sepsis would be characterized by a dominant anti-inflammatory response, an immunocompromised state [30]. Clinical trials, however, have not confirmed this hypothesis yet. Our study points out that the elderly has an efficient immune profile, very similar to the young patient.

Our study has limitations. The major limitation is the sample size. A recent clinical study, however, was unable to find any age-related difference in inflammatory and cell surface markers in patients hospitalized for pneumonia [12]. Similarly, Kelly et al. found no differences in the cytokine profile of young, older and very elderly patient with community-acquired pneumonia [31]. We believe that our data brings important information and should be further explored in larger studies. Once confirmed, studies of immunosenescence should focus on defects in phagocytosis, production of reactive oxygen species, immunoglobulins and other cell functions that were not addressed by the present study.

Conclusions

Our study describes that aged individuals display a competent immune profile, regarding the secretion of cytokines, chemokines and growth factors. Further research is warranted to explain the molecular mechanisms why aged individuals develop higher rates of infection and might display worse outcomes, a relevant topic on immune-inflammatory responses in ageing. Here, we point out that the results in animal models

diverge from clinical research and argue against the current concept that sepsis in older people is characterized by CARS, a massive counter-antagonistic response to systemic inflammation. Larger studies are necessary to confirm our data and explore other aspects of immunity in this population.

Methods

Study design

The current study was a prospective cohort, conducted in one of the Hospital das Clínicas Intensive Care Units (University of São Paulo, Brazil). Surgical patients, trauma and coronary syndromes are usually admitted at other ICUs from our hospital, what makes our population very homogeneous. Indeed, the five following reasons account for more than 90% of the ICU admissions included in this study: sepsis, stroke, altered level of consciousness, pulmonary edema and asthma/COPD. Patients less than 18 years old, pregnant, with disseminated malignancies or receiving chemotherapy, HIV-positive, advanced hepatic disease, in end-of-life conditions and those that refused to participate in this study were excluded. The remaining patients were divided in two groups: 1) ICU control (patients admitted to the ICU for non-infectious causes); 2) septic shock group (patients admitted to the ICU for septic shock or that developed septic shock during the ICU stay). 90% of data from septic elderly were taken on hospital day 1 compared to 90% from elderly controls. Each group was divided in two sub-groups: under 65 years-old (young individuals) and above 65 years-old (aged individuals). Data and blood samples were collected at patient's admission or when the diagnosis of severe sepsis or septic shock was established by the medical staff. SIRS, Severe sepsis and septic shock were defined, according to the consensus proposed in 1992 [32]. The protocol was approved by Hospital das Clínicas Ethical Committee and patients (or their close relatives) received detailed explanations and provided written consent to be included in the study protocol.

Statistical analysis

A descriptive analysis of the population (age, sex, electrolytes, SOFA score and mortality) was performed. SOFA score assesses mortality in the critically ill. Cytokines were analyzed by Miliplex technology (Merck, Genex diagnostics), a multiplex method for cytokines analysis. Continuous variables were analyzed by using Student's *t* test or Mann-Whitney test, as appropriated. Categorical variables were analyzed by using chi-square test. Results were reported as mean $\pm$ standard deviation. All analysis performed used SPSS 19.0 software. A *p* value of .05 was considered to be statistically significant.

Competing interests

The authors have no financial or ethical conflicts of interest.

Authors' contributions

FPS designed the experiments and wrote the paper, FGZ collected the samples, DFB and HVB performed the experiments, ACG and FTF designed the data bank. The remaining authors supervised the study. All authors revised the first draft. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The current study is part of an ongoing prospective cohort study, designed to store clinical data and biological samples for multiple projects and conceived by HPS and LMCN (Brazilian Initiative for Sepsis Knowledge, BRISK Project). FPS is supported by FAPESP, São Paulo Research Foundation (grant # 2009/17731-2). We would like to express our gratitude to the patients and their families for consenting to participate in this study.

Received: 16 January 2013 Accepted: 2 June 2013

Published: 6 June 2013

References

1. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK: Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol* 2001, 8(3):131-6.
2. Haynes L, Maue AC: Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol* 2009, 21(4):414-7.
3. Maue AC, Haynes L: CD4+ T Cells and Immunosenescence - A Mini-Review. *Gerontology* 2009, 55(5):491-495.
4. Maue AC, et al: T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends Immunol* 2009, 30(7):301-5.
5. Pawelec G, et al: Impact of aging on innate immunity. *J Leukoc Biol* 1998, 64(6):703-12.
6. Shaw AC, et al: Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 2010, 22(4):507-13.
7. Panda A, et al: Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol* 2009, 30(7):325-33.
8. Han D, et al: Age-related enhancement of tumor necrosis factor (TNF) production in mice. *Mech Ageing Dev* 1995, 84(1):39-54.
9. Effros RB, Svoboda K, Walford RL: Influence of age and caloric restriction on macrophage IL-6 and TNF production. *Lymphokine Cytokine Res* 1991, 10(5):347-51.
10. Angus DC, et al: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001, 29(7):1303-10.
11. Kale SS, Yende S: Effects of Aging on Inflammation and Hemostasis through the Continuum of Critical Illness. *Ageing Dis* 2011, 2(6):501-11.
12. Kale S, et al: The effects of age on inflammatory and coagulation-fibrinolysis response in patients hospitalized for pneumonia. *PLoS One* 2010, 5(11):e13852.
13. Martin GS, Mannino DM, Moss M: The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med* 2006, 34(1):15-21.
14. Pinheiro da Silva F, et al: Decreased Parathyroid hormone levels despite persistent hypocalcemia in patients with kidney failure recovering from septic shock. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2012, in press.
15. Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H: Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* 2004, 39(5):687-99.
16. Tateda K, et al: Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infect Immun* 1996, 64(3):769-74.
17. Turnbull IR, et al: Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. *Shock* 2003, 19(4):310-3.
18. Gardner ID: The effect of aging on susceptibility to infection. *Rev Infect Dis* 1980, 2(5):801-10.
19. Almanzar G, et al: Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *J Virol* 2005, 79(6):3675-83.
20. Schmaltz HN, et al: Chronic cytomegalovirus infection and inflammation are associated with prevalent frailty in community-dwelling older women. *J Am Geriatr Soc* 2005, 53(5):747-54.

21. White JC, et al: Impairment of antibacterial defense mechanisms of the lung by extrapulmonary infection. *J Infect Dis* 1986, 153(2):202-8.
22. Mason CM, et al: Intraperitoneal lipopolysaccharide suppresses pulmonary antibacterial defense mechanisms. *J Infect Dis* 1997, 176(5):1293-302.
23. Bradley SF, et al: Monokine secretion in aging and protein malnutrition. *J Leukoc Biol* 1989, 45(6):510-4.
24. Bruley-Rosset M, Veignon I: Interleukin-1 synthesis and activity in aged mice. *Mech Ageing Dev* 1984, 24(3):247-64.
25. Eshier WB, et al: Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine Cytokine Res* 1993, 12(4):225-30.
26. Fagiolo U, et al: Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* 1993, 23(9):2375-8.
27. Santulli G, Iaccarino G: Pinpointing beta adrenergic receptor in ageing pathophysiology: victim or executioner? Evidence from cime scenes. *Immun Ageing* 2013, 10(1):10.
28. Nakada TA, et al: beta2-Adrenergic receptor gene polymorphism is associated with mortality in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2010, 181(2):143-9.
29. Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996, 24(7):1125-8.
30. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003, 348(2):138-50.
31. Kelly E, et al: Community-acquired pneumonia in older patients: does age influence systemic cytokine levels in community-acquired pneumonia? *Respiology* 2009, 14(2):210-6.
32. Bone RC, et al: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992, 101(6):1644-55.

doi:10.1186/1742-4933-10-21

Cite this article as: Pinheiro da Silva et al.: Septic shock in older people: a prospective cohort study. *Immunity & Ageing* 2013 10:21.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

Anexo E - Gomes Cunha DM et al. Increased intestinal production of α -defensins in aged rats with acute pancreatic injury. *Experimental Gerontology* (submitted)

**Increased intestinal production of α -defensins in aged rats with
acute pancreatic injury**

Débora Maria Gomes Cunha, Marcia Kiyomi Koike, Denise Frediani Barbeiro,
Hermes Vieira Barbeiro, Mike Yoshio Hamasaki, Guilherme Tude Coelho Neto,
Marcel Cerqueira César Machado and Fabiano Pinheiro da Silva

Emergency Medicine Department, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Corresponding author

Fabiano Pinheiro da Silva, M.D., Ph.D.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Laboratório de Emergências Clínicas (LIM-51)

Av. Dr. Arnaldo, 455 sala 3189, CEP 01246-000, São Paulo - SP, Brazil

Phone: +55.11.3061.8480

Fax: +55.11.3061.8480

E-mail: pinheirofabiano@hotmail.com

Abstract

Acute pancreatitis is a life-threatening situation, frequently associated with uncontrolled local and systemic inflammation, and aging is associated with a worst prognosis. Antimicrobial peptides are ancient molecules that belong to innate immunity and are able to trigger a myriad of effector responses. We have hypothesized that antimicrobial peptides could play an important role during serious pancreatic injury. To investigate our hypothesis, α -defensins-5, α -defensins-7 and CRAMP gene expression levels were measured in the intestinal tissue of old and young rats submitted to chemical pancreatic damage. We found significantly higher levels of α -defensin-5 and α -defensin-7, but not CRAMP, in the samples from old mice. This increase was not associated with a worst systemic inflammatory response. We conclude that α -defensins may have a pivotal role during acute pancreatitis and that the elderly develops a more severe inflammatory process.

Keywords: α -defensins, pancreatitis, rats, elderly, antimicrobial peptides, intestine

Abbreviations: AMPs, antimicrobial peptides; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; DEFA, α -defensin; IFN, interferon; TLR, Toll-like receptors

1. Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are evolutionary conserved molecules produced by vertebrates, insects, and plants. They are considered “natural antibiotics” because they directly kill invading pathogens by creating pores to disrupt their cell membranes. In addition to these antimicrobial properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria, protozoa, fungi, and viruses, many other functions were recently described (Guani-Guerra and others 2010; Lai and Gallo 2009; Pinheiro da Silva and Machado 2012; Zasloff 2002).

AMPs are produced mainly by epithelial cells, probably because these sites are in constant contact with the external environment and are more likely to be exposed to microbial attack (Beger and others 1997; Cappell 2008). Susceptible sites that produce AMPs include the intestinal mucosa, skin, and respiratory and reproductive tracts.

Integrity of the intestinal barrier is of critical importance for maintaining health. Diseases that alter intestinal permeability, such as sepsis or acute pancreatitis, are associated with high morbidity and mortality rates. Acute pancreatitis is a common disease in critical care and is caused by alcoholism or gallstones (Cappell 2008). The prognosis of acute pancreatitis is directly related to the intensity of inflammation. Elevated levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF α) are associated with higher mortality rates and are used in the clinical to measure the severity of inflammatory responses. A counter-regulatory anti-inflammatory response characterized by the production of mediators such as IL-10 (Bhatia and others 2000; Bhatia and others 2001;

Coelho and others 1997; Sakorafas and Tsiotou 2000) is concomitantly triggered to prevent tissue damage caused by excessive inflammation.

There has been an increase in life expectancy in economically developed countries and, more recently, in less developed countries. Many studies have investigated the inflammatory profile of the elderly during inflammatory catastrophes (Pinheiro da Silva and others 2013), but it remains inconclusive whether older patients can mount an effective immune response. Patients with advanced age have increased susceptibility to postoperative infections (Franceschi and others 2000) and show an increase in overall hospital mortality. Although these events might be related to depletion of the immune system, our group observed a similar inflammatory profile when older septic patients were compared with young septic patients (Pinheiro da Silva and others 2013).

The aim of this study was to verify the local levels of intestinal antimicrobial peptides and the systemic inflammatory profile of young and old rats with acute pancreatitis.

2. Material and methods

2.1. Animals and model of acute pancreatitis

All experiments were performed at the Laboratory of Emergency Medicine (LIM-51), University of São Paulo Faculty of Medicine, Brazil.

Wistar male rats, 280–350 g, were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg of body weight, Parke-Davis, São Paulo, Brazil) and xylazine (10 mg/kg of animal body weight, Bayer HealthCare, Toronto, Canada).

The animals were then divided into the following groups: Young Pancreatitis (n = 10); Young Control (n = 17); Old Pancreatitis (n = 8); Old Controls (n = 10); Young Sham (n = 5); and Old Sham (n = 4).

Acute pancreatitis was induced by injecting 2.5% taurocholic acid (Sigma Chemical Company TM, St. Louis, MO, USA) at a dose of 0.1 mL/100 g body weight. After 12 h, the terminal ileum of the intestine was collected for molecular analysis by RT-PCR. Blood was collected from the cava vein and serum was separated for Miliplex analysis.

2.2. Gene expression by RT-PCR analysis

α -Defensins-5 (DEFA5), α -defensins-7 (DEFA7), CRAMP, and TNF α mRNA levels were determined by RT-PCR. The sequences of primers used in this study are described in **Table 1**.

2.3. Miliplex analysis

TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, interferon- γ (IFN γ), IP-10, and IL-18 serum levels were measured by Miliplex Technology (Millipore, USA) and analyzed using the MAGPIX Xponent software.

2.4. Statistical analysis

Results were compared by ANOVA or the Kruskal–Wallis test, as appropriate. A p-value of < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 5.0 for Windows.

3. Results

We performed gene expression analysis of α -defensin-7, α -defensin-5, CRAMP, and TNF α levels. α -defensins levels were significantly higher in aged animals with pancreatitis compared with all other groups ($p < 0.001$) (**Figure 1A and 1B**). The levels of CRAMP were statistically similar in the aged and young groups (**Figure 1C**). TNF α gene expression levels, a well-known marker of inflammation, were significantly higher in the terminal ileum of aged rats with acute pancreatitis than in all other groups ($p < 0.001$) (**Figure 1D**).

Interestingly, serum TNF α levels of aged and young rats were similar during the pancreatic insult (**Figure 2A**), indicating differences in inflammatory status are only observed at the local level. Furthermore, systemic IL-10 levels (**Figure 2B**), serum IL-1 β (**Figure 3A**) and IL-18 levels (**Figure 3C**) were similar in all study groups. Despite its enhanced production following pancreatic injury, serum IL-6 levels of aged animals were similar to those detected in the young group (**Figure 3B**). Aged and young animals, moreover, exhibited similar serum levels of IFN γ (**Figure 4A**) and IP-10 (**Figure 4B**).

4. Discussion

The molecular investigation of aging has attracted increased attention from the scientific community, because it is associated with diseases such as atherosclerosis, Alzheimer's disease, type 2 diabetes mellitus, and other major causes of death worldwide. Senescence, characterized by chronically elevated levels of inflammatory markers such as TNF, IL-1 β , IL-6, and C-reactive protein (Bruunsgaard and others 2001), might influence various components of the immune system. Profound changes in the function of T cells, especially T regulatory and Th17 cells, were described in the elderly (Haynes and Maue

2009; Maue and Haynes 2009). Regarding innate immunity, changes caused by aging have been described in macrophages, polymorphonuclear cells, and natural killer cells (Pawelec and others 1998; Shaw and others 2010). However, discrepant results have been reported and the inflammatory status of the elderly during critical illness is under intense investigation (Panda and others 2009). While some studies reported increased proinflammatory activity in the elderly during acute stress compared with the young (Han and others 1995), others have described opposite results (Effros and others 1991).

Acute pancreatitis has mild and severe forms and the latter is notoriously associated with high mortality rates. Severe acute pancreatitis is characterized by pancreatic and peri-pancreatic necrosis and systemic complications, often leading to multiple organ failure (Fan and others 1988). Why older adults exhibit a higher mortality rate than the young remains unclear.

The intestinal barrier plays a key role in acute pancreatitis (Fu and others 2012), because increased gut permeability can lead to bacterial translocation and exacerbated inflammatory responses (Ammori and others 1999; Beger and others 1986). AMPs, especially α -defensins and cathelicidin LL-37, produced by the gut epithelial barrier, might contribute to the maintenance of intestinal integrity (Yasuda and others 2006).

Tiszlavicz et al. (Tiszlavicz and others 2010) demonstrated that variations in the copy number of the β -defensin gene were associated with increased severity of acute pancreatitis. In their study, a high number of copies of the β -defensin gene predicted a worse outcome and a study by Gallo et al. (Gallo and others 1997) showed a reduction in the expression levels of CRAMP in the

intestine of young mice compared with neonatal mice, suggesting CRAMP might have a protective role in neonatal mice.

Several studies reported a reduction of α -defensin production in the terminal ileum of patients with Crohn's disease and patients with colitis exhibited decreased β -defensin production in the colon. Overall, these studies suggest that a decrease in intestinal defensin production facilitates bloodstream infection through the gut.

In the current study, we found that α -defensins-5 and 7 were considerably increased in the elderly rat group compared with the young group, during acute pancreatitis. Recent experiments from our group demonstrated that bacterial translocation was increased in aged rats compared with young rats (*manuscript in preparation*), and that acute pancreatitis was more severe in elderly than in young animals.

Previous studies demonstrated Toll-like receptors (TLRs) play a crucial role in the production of defensins in the gastrointestinal system. A recent study by Ayala-Sumuano et al. (Ayala-Sumuano and others 2013) demonstrated that *Entamoeba histolytica* activated TLRs2 and 4, inducing the potent production of β -defensin-2. Rizzo et al. also showed that *Chlamydia pneumoniae* induced TLR4 activation and subsequent β -defensin-2 production (Rizzo and others 2008). Scarpa and colleagues studied patients with ulcerative colitis and showed increased α -defensin 5 and 6 gene expression after surgical procedures (Scarpa and others 2012). Chalifour et al. demonstrated natural killer cells activated by TLR agonists produced excessive levels of α -defensin-5 and IFN γ (Chalifour and others 2004).

We propose that older rats have defective intestinal integrity and that during acute pancreatitis there is enhanced bacterial translocation, which triggers a greater production of α -defensins by Paneth cells, the major source of intestinal AMPs. TLR receptors activated by danger signals and bacteria can stimulate antimicrobial peptide synthesis and release.

The significant increase in TNF α gene expression in aged animals confirmed that aged rats developed more severe local inflammation compared with young rats. Interestingly, a study by Hughes et al. demonstrated an increase in TNF α levels in both the abdominal compartment and in distant organs, such as the lung (Hughes and others 1995).

5. Conclusion

The mechanisms underlying the increased severity of acute pancreatitis in the elderly are complex. Here, we showed that aged rats exhibited increased intestinal production of α -defensins compared with young rats. This was associated with exacerbated bacterial translocation that might affect the elderly. Antimicrobial peptide release, moreover, might further increase inflammatory processes, because they activate many immune pathways, creating a vicious deleterious circle. Although antimicrobial peptides are very effective alarmins, they might also aggravate local injury. Therefore, further studies are warranted to investigate the multiple effects that antimicrobial peptides might exert on the inflammatory course of acute pancreatitis.

Acknowledgments

FPS is supported by FAPESP, Sao Paulo Research Foundation (Grant No. 2009/17731-2) and CNPq, The National Council for Scientific and Technological

Development (Grant No. 470539/2013-15).

Conflicts of interest

The authors declare that they have no financial or ethical conflicts of interest.

Figure Legends

Figure 1. Gene expression of α -defensin-5 (A), α -defensin-7 (B), CRAMP (C), and TNF- α (D) in the distal ileum of rats.

Figure 2. Determination of TNF- α (A) and IL-10 (B) serum levels.

Figure 3. Determination of IL-1 β (A), IL-6 (B) and IL-18 (C) serum levels.

Figure 4. Determination of IFN γ (A) and IP-10 (B) serum levels.

Table 1. Sequence of primers used in this study.

References

- Ammori, B.J.; Leeder, P.C.; King, R.F.; Barclay, G.R.; Martin, I.G.; Larvin, M.; McMahon, M.J. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg.* 3:252-262; 1999
- Ayala-Summano, J.T.; Tellez-Lopez, V.M.; Dominguez-Robles Mdel, C.; Shibayama-Salas, M.; Meza, I. Toll-like receptor signaling activation by *Entamoeba histolytica* induces beta defensin 2 in human colonic epithelial cells: its possible role as an element of the innate immune response. *PLoS Negl Trop Dis.* 7:e2083; 2013
- Beger, H.G.; Bittner, R.; Block, S.; Buchler, M. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. *Gastroenterology.* 91:433-438; 1986
- Beger, H.G.; Rau, B.; Mayer, J.; Pralle, U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg.* 21:130-135; 1997
- Bhatia, M.; Brady, M.; Shokuchi, S.; Christmas, S.; Neoptolemos, J.P.; Slavin, J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol.* 190:117-125; 2000
- Bhatia, M.; Neoptolemos, J.P.; Slavin, J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2:496-501; 2001
- Brunsgaard, H.; Pedersen, M.; Pedersen, B.K. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol.* 8:131-136; 2001
- Cappell, M.S. Acute pancreatitis: etiology, clinical presentation, diagnosis, and therapy. *Med Clin North Am.* 92:889-923, ix-x; 2008
- Chalifour, A.; Jeannin, P.; Gauchat, J.F.; Blaecke, A.; Malissard, M.; N'Guyen, T.; Thieblemont, N.; Delneste, Y. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood.* 104:1778-1783; 2004
- Coelho, A.M.; Machado, M.C.; Sampietre, S.N.; Leite, K.R.; Oliveira, V.L.; Pinotti, H.W. Hepatic damage during acute pancreatitis in the rat. *Braz J Med Biol Res.* 30:947-953; 1997
- Effros, R.B.; Svoboda, K.; Walford, R.L. Influence of age and caloric restriction on macrophage IL-6 and TNF production. *Lymphokine Cytokine Res.* 10:347-351; 1991
- Fan, S.T.; Choi, T.K.; Lai, C.S.; Wong, J. Influence of age on the mortality from acute pancreatitis. *Br J Surg.* 75:463-466; 1988
- Franceschi, C.; Bonafe, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; De Luca, M.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 908:244-254; 2000
- Fu, S.; Stanek, A.; Mueller, C.M.; Brown, N.A.; Huan, C.; Bluth, M.H.; Zenilman, M.E. Acute pancreatitis in aging animals: loss of pancreatitis-associated protein protection? *World J Gastroenterol.* 18:3379-3388; 2012
- Gallo, R.L.; Kim, K.J.; Bernfield, M.; Kozak, C.A.; Zanetti, M.; Merluzzi, L.; Gennaro, R. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem.* 272:13088-13093; 1997
- Guani-Guerra, E.; Santos-Mendoza, T.; Lugo-Reyes, S.O.; Teran, L.M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 135:1-11; 2010
- Han, D.; Hosokawa, T.; Aoike, A.; Kawai, K. Age-related enhancement of tumor necrosis factor (TNF) production in mice. *Mech Ageing Dev.* 84:39-54; 1995
- Haynes, L.; Maue, A.C. Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol.* 21:414-417; 2009
- Hughes, C.B.; Henry, J.; Kotb, M.; Lobashevsky, A.; Sabek, O.; Gaber, A.O. Up-regulation of TNF alpha mRNA in the rat spleen following induction of acute pancreatitis. *J Surg Res.* 59:687-693; 1995

- Lai, Y.; Gallo, R.L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30:131-141; 2009
- Maue, A.C.; Haynes, L. CD4+ T cells and immunosenescence—a mini-review. *Gerontology.* 55:491-495; 2009
- Maue, A.C.; Yager, E.J.; Swain, S.L.; Woodland, D.L.; Blackman, M.A.; Haynes, L. T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends Immunol.* 30:301-305; 2009
- Panda, A.; Arjona, A.; Sapey, E.; Bai, F.; Fikrig, E.; Montgomery, R.R.; Lord, J.M.; Shaw, A.C. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* 30:325-333; 2009
- Pawelec, G.; Solana, R.; Remarque, E.; Mariani, E. Impact of aging on innate immunity. *J Leukoc Biol.* 64:703-712; 1998
- Pinheiro da Silva, F.; Machado, M.C. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides.* 36:308-314; 2012
- Pinheiro da Silva, F.; Zampieri, F.G.; Barbeiro, D.F.; Barbeiro, H.V.; Goulart, A.C.; Torggler Filho, F.; Velasco, I.T.; da Cruz Neto, L.M.; de Souza, H.P.; Machado, M.C. Septic shock in older people: a prospective cohort study. *Immunity & ageing: I & A.* 10:21; 2013
- Rizzo, A.; Paolillo, R.; Buommino, E.; Lanza, A.G.; Guida, L.; Annunziata, M.; Carratelli, C.R. Modulation of cytokine and beta-defensin 2 expressions in human gingival fibroblasts infected with *Chlamydia pneumoniae*. *Int Immunopharmacol.* 8:1239-1247; 2008
- Sakorafas, G.H.; Tsiotou, A.G. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *J Clin Gastroenterol.* 30:343-356; 2000
- Scarpa, M.; Grillo, A.; Scarpa, M.; Brun, P.; Castoro, C.; Pozza, A.; Cavallo, D.; Faggian, D.; Ruffolo, C.; D'Inca, R.; Bordini, R.; Castagliuolo, I.; Angriman, I. Innate immune environment in ileal pouch mucosa: alpha5 defensin up-regulation as predictor of chronic/relapsing pouchitis. *J Gastrointest Surg.* 16:188-201; discussion 201-182; 2012
- Shaw, A.C.; Joshi, S.; Greenwood, H.; Panda, A.; Lord, J.M. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 22:507-513; 2010
- Tiszlavicz, Z.; Szabolcs, A.; Takacs, T.; Farkas, G.; Kovacs-Nagy, R.; Szantai, E.; Sasvari-Szekely, M.; Mandi, Y. Polymorphisms of beta defensins are associated with the risk of severe acute pancreatitis. *Pancreatology.* 10:483-490; 2010
- Yasuda, T.; Takeyama, Y.; Ueda, T.; Shinzeki, M.; Sawa, H.; Nakajima, T.; Kuroda, Y. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res.* 135:18-26; 2006
- Zaslloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature.* 415:389-395; 2002

Figure(s)

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 4

TABLE 1

GEN	PRIMERS	ANNEALING (°C)	CYCLES
DEFA7	sense: ATGAGGACGCTCACTCTG CT anti-sense: ATCCCCTCCAAAGGATATGG	60°C	40
DEFA5	sense: GGACGCTCACTCTGCTTA CC anti-sense: TCTTGGAGAGCAGTGCCTTT	60°C	40
CRAMP	sense: AAGTATGTGAGGTTCCGAGTG AA anti-sense: ArCCAAACTTCTCTCCACCTTTTC	60°C	38
TNF α	sense: ACTCCCAGAAAAGCAAGC AA anti-sense: CGAGCAGGAATGAGAAGAGG	60°C	40
IL-10	sense: GAATTCCTGGGAGAGAAGC anti-sense: CGGGTGGTTCAATTTTTC AT	60°C	40
Housekeeping GAPDH	sense: ATGATT CTA CCCACGGCA AG anti-sense: CTGGAAGATGGTGATGGGTT	60°C	40

Anexo F - Pinheiro da Silva F et al. Decreased parathyroid hormone levels despite persistent hypocalcemia in patients with kidney failure recovering from septic shock. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2013 Jun;13(2):135-42.

Decreased Parathyroid Hormone Levels Despite Persistent Hypocalcemia in Patients with Kidney Failure Recovering from Septic Shock

Fabiano Pinheiro da Silva^{1,*}, Fernando Godinho Zampieri¹, Hermes Vieira Barbeiro¹, Francisco Torggler Filho¹, Alessandra Carvalho Goulart^{1,2}, Vanda Jorgetti³, Irineu Tadeu Velasco¹, Luiz Monteiro da Cruz Neto¹ and Heraldo Possolo de Souza¹

¹*Emergency Medicine Department, University of Sao Paulo, Brazil;* ²*Internal Medicine Department, Hospital Universitário, University of Sao Paulo, Brazil;* ³*Nephrology Department, University of Sao Paulo, Brazil*

Abstract: *Introduction:* Hypocalcemia is a common and poorly understood finding in critically ill patients. The current study was designed to assess the association of ionized calcium, vitamin D, phosphorus and Parathyroid hormone levels in a cohort of patients with and without kidney dysfunction admitted for sepsis or non-infectious causes.

Methods: Prospective cohort clinical and biochemical study.

Results: We confirmed that hypocalcemia and hypovitaminosis D are a common finding in critically ill patients. Parathyroid hormone levels significantly rise in septic shock. In the recovery phase, however, despite persistent hypocalcemia, Parathyroid hormone levels abruptly decrease in patients with kidney dysfunction, but not in patients with normal renal function.

Conclusions: The systemic inflammatory response syndrome probably leads to inappropriately high Parathyroid hormone levels during septic shock. In the recovery phase, Parathyroid hormone levels decrease, but calcium levels remain low, displaying evidence that the parathyroid is not responding as expected.

Since Parathyroid hormone receptors and calcium-sensing receptors have been described in immune cells and other cell types, we propose that these effects may have a plethora of other deleterious effects, with important implications to the pathogenesis of septic shock.

Keywords: Parathyroid hormone, vitamin D, calcium, sepsis, renal failure, critical illness.

INTRODUCTION

As the elderly population grows, an increased number of patients are admitted to hospitals with chronic diseases. In such individuals, the incidence of both community-acquired and nosocomial infections is higher [1]. Notably, patients with chronic kidney disease represent an important group, since they have significant co-morbidities and an increased incidence of sepsis, compared to individuals with normal renal function [2]. Indeed, sepsis is the most common cause of hospitalization in this population [3].

In the Intensive Care Unit (ICU), moreover, many patients develop septic acute kidney injury [4], in which mortality ranges from 20% to 60% [5]. Patients with renal dysfunction, thus, are a major health problem and a significant percentage of septic patients.

The influence of factors such as uremia [6-8], electrolytic balance, acid-base disorders and others has been extensively debated in the immune response during septic shock. Various

aspects, such as anemia, opsonisation defects and deficiencies in vitamins and trace elements have been associated with the increased rate of sepsis in patients with end-stage renal disease [3]. Besides that, the molecular interconnections among renal dysfunction, the immune system and inflammation are poorly characterized.

The kidneys are responsible for calcium absorption, phosphate and magnesium excretion and for hydroxylation of vitamin D to its active form, resulting in calcium absorption at the gastrointestinal level. Parathyroid hormone (PTH), however, is the most important and sensitive regulator of calcium levels, orchestrating its renal absorption and bone mobilization [9], to maintain tightly controlled serum concentrations.

Despite the fact that some sparse publications have investigated calcium [10], vitamin D [11] and even PTH responsiveness in the critically ill [10], most studies have been done in animals [12-14], using models of sepsis that may not reflect the complexity of the disease [15, 16]. A single study evaluating all of these factors at multiple time points in both septic and non-septic individuals is lacking.

The present study focuses on the role of PTH in sepsis and its connections with vitamin D, calcium and phosphate homeostasis, exploring its possible biological consequences.

*Address correspondence to this author at the Faculdade de Medicina da USP, Laboratório de Emergências Clínicas (LIM/51), Av. Dr. Arnaldo, 455 sala 3189, CEP: 01246-903, São Paulo, SP, Brazil; Tel/Fax: 55.11.3061.8480; E-mail: pinheirofabiano@hotmail.com

Accordingly, we sought to assess their serum levels in patients with both normal and high creatinine levels admitted to our ICU for infectious and non-infectious reasons.

MATERIAL AND METHODS

Study Design

The current study was a prospective cohort, conducted in one of the Hospital das Clínicas Intensive Care Units (University of São Paulo, Brazil). Surgical patients, trauma and coronary syndromes are usually admitted to other ICUs from our hospital, which makes our population very homogeneous. Indeed, the five following reasons account for more than 90% of the ICU admissions included in this study: sepsis, stroke, altered level of consciousness, pulmonary edema and asthma/COPD. Patients less than 18 years old, pregnant, with disseminated malignancies or receiving chemotherapy, HIV-positive, advanced hepatic disease, in end-of-life conditions and those that refused to participate in this study were excluded. The remaining patients were divided in four groups: 1) ICU control (patients admitted to the ICU for non-infectious causes); 2) severe sepsis group (patients admitted to the ICU for severe sepsis or that developed severe sepsis during the ICU stay); 3) septic shock group (patients admitted to the ICU for septic shock or that

developed septic shock during the ICU stay); 4) recovery phase group (patients that survive septic shock, remaining 48 hours without vasopressors or hemodynamic instability and presenting clinical and laboratory improvement of the infection as judged by members of the medical staff not participating in the investigation). Each group was divided in two sub-groups: serum creatinine ≤ 1.2 mg/dl (normal creatinine) and serum creatinine > 1.2 mg/dl (high creatinine). Data and blood samples were collected at patient's admission or when the diagnosis of severe sepsis or septic shock was established by the medical staff. Every patient enrolled in the recovery phase comes from the septic shock group. The remaining groups are independent. Severe sepsis and septic shock were defined, according to the consensus proposed in 1992 [17]. The protocol was approved by Hospital das Clínicas Ethical Committee and patients (or their close relatives) received detailed explanations and provided written consent to be included in the study protocol.

PTH, Vitamin D and Electrolytes Measurements

After blood collection, samples were immediately sent for analysis at the Hospital das Clínicas Central Laboratory. Serum ionized calcium, phosphate, magnesium, albumin, creatinine, vitamin D and PTH were measured.

Table 1. Population characteristics and Kidney injury patients profile, according to Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO, reference 18).

Population Characteristics					
	ICU control (n=54)	Severe sepsis (n=18)	Septic shock (n=35)	Recovery phase (n=13)	Significance <i>p</i>
Male sex					
Normal creatinine	9 (26.5%)	2 (22.2%)	4 (33.3%)	4 (66.7%)	0.178
High creatinine	12 (63%)	8 (88.9%)	12 (52%)	4 (57%)	0.224
Age (yrs)					
Normal creatinine	49 $\pm$ 14	41 $\pm$ 15	40 $\pm$ 16	48 $\pm$ 19	0.834
High creatinine	53 $\pm$ 17	57 $\pm$ 23	60 $\pm$ 15	58 $\pm$ 19	0.383
Renal function (mg/dl)					
Normal creatinine	34 (62.96%)	9 (50%)	12 (34.30%)	6 (46.15%)	0.803
High creatinine	19 (37.04%)	9 (50%)	23 (65.70%)	7 (53.85%)	0.841
Kidney injury classification					
Acute kidney injury	11 (58%)	4 (44%)	13 (56%)	3 (43%)	0.467
Chronic kidney injury (Stages 1 to 4)	4 (21%)	4 (44%)	5 (22%)	3 (43%)	0.404
Chronic kidney injury (Stages 5D)	4 (21%)	1 (12%)	5 (22%)	1 (14%)	0.793
SOFA score					
Normal creatinine	1.94 $\pm$ 1.85	3.30 $\pm$ 1.64	6.36 $\pm$ 4.43	2.2 $\pm$ 2.17	<0.001
High creatinine	5.59 $\pm$ 2.91	5.33 $\pm$ 2.40	10.55 $\pm$ 2.98	4.0 $\pm$ 2.0	<0.001
ICU mortality					
Normal creatinine	1 (3%)	1 (11%)	3 (25%)	0 (0%)	0.084
High creatinine	4 (21%)	0 (0%)	9 (39%)	1 (14%)	0.104

Statistical Analysis

A descriptive analysis of the population (age, sex, SOFA score) was performed. PTH, vitamin D and electrolytes values were analyzed and compared. Continuous variables were analyzed by using Student's *t* test or analysis of variance (ANOVA), as appropriated. Post hoc analysis was performed using LSD test. Categorical variables were analyzed by using chi-square test. Results were reported as mean $\pm$ standard deviation. All analysis performed used SPSS 19.0 software. A *p* value of .05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

We studied 107 patients admitted to the ICU (54 admitted for non-infectious reasons and 53 in the severe sepsis or septic shock groups) between October 2010 and March 2012. Patients in the septic shock group with high

creatinine levels had similar intra-hospital case-fatality rate, when compared to those in septic shock with normal creatinine levels or controls. Patients in all groups had similar age, sex distribution and ICU mortality (Table 1). SOFA score was significantly higher in patients belonging to the septic shock group compared to the other groups. A number of patients stratified according to their creatinine levels and the number of patients per group with acute kidney disease or chronic kidney disease, classified according to Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) [18], are also shown in Table 1. Ionized calcium levels were significantly lower in the recovery phase compared to those controlled, regardless of creatinine levels ($p=0.015$, high creatinine group; $p=0.04$, normal creatinine group). Mean ionized calcium levels in the septic shock group were lower than those in the control group, for patients in the normal creatinine group ($p=0.007$, Fig. 1A).

Fig. (1). Ionized calcium levels; serum phosphate levels; serum magnesium levels and serum albumin levels. Patients with normal creatinine levels are shown in grey, patients with high creatinine levels in black (number of samples in each sub-group are in parentheses, dotted lines shows higher and lower than normal values).

Fig. (2). Vitamin D and PTH serum levels. Patients with normal creatinine levels are shown in grey, patients with high creatinine in black (number of samples collected are in parentheses, dotted lines shows higher and lower than normal values). Vitamin D levels below 30 ng/ml are considered insufficient.

Patients with high creatinine levels in the control, septic shock and recovery phase groups showed increased serum phosphate levels, compared to patients with normal creatinine levels ($p=0.015$, 0.039 and 0.025 , Fig. 1B).

Serum magnesium levels were similar in all four groups of comparison (Fig. 1C). Hypoalbuminemia was a common feature in all groups. Patients belonging to the same study group had similar serum albumin levels. Patients in ICU control, however, showed serum albumin levels significantly lower than both septic shock and recovery phase groups (Fig. 1D). Albumin administration is not a part of our resuscitation protocol.

Hypovitaminosis D was a common finding for the whole population, but we did not find significant differences across main groups or sub-groups (Fig. 2A).

In the control group, PTH levels were significantly higher in patients with high creatinine levels, when compared to individuals with normal creatinine ($p=0.002$, Fig. 2B). In the severe sepsis, septic shock and recovery phase groups, however, both sub-groups showed similar PTH levels (Fig. 2B). PTH levels from patients with high creatinine levels significantly decreased in the recovery phase, compared to patients in septic shock ($p=0.013$). The same difference could not be detected for patients with normal renal creatinine levels (Fig. 2B). In both sub-groups, moreover, a significant rise in PTH levels could be detected, in patients with severe sepsis compared to those in septic shock ($p=0.034$ and 0.008 , respectively, Fig. 2B).

DISCUSSION

Hypocalcemia is a common finding in critically ill patients and has been attributed to vitamin D insufficiency,

1 α -hydroxylase deficiency, chelation, intracellular overload and “relative” hypoparathyroidism [19]. In our study, hypocalcemia was detected in every group studied, independently of patient’s renal function. Our results, thus, suggest that despite the fact that the kidneys play a key role in calcium homeostasis (due to vitamin D activation, calcium absorption and PTH effector functions), these effects do not entirely explain the hypocalcemia found in critical illness. As the effects of systemic inflammation in patient’s renal function are poorly understood, we cannot exclude the presence of renal cellular dysfunction, even in the presence of normal serum creatinine levels, since tubular injury may be a feature of sepsis-related acute kidney injury [20].

Hypocalcemia is considered to be a marker of disease severity, rather than a cause of increased mortality [21]. Indeed, a recent study showed that only extreme abnormalities of ionized calcium concentrations are independent predictors of mortality [22]. No randomized clinical trial, however, has examined the effect of parenteral calcium administration on mortality and a recent systematic review concluded that there is no clear evidence that it impacts the outcome of critically ill patients [23]. The Surviving Sepsis Campaign, moreover, does not recommend calcium administration as a routine in their guidelines [24].

Calcium has a myriad of cellular function, including effects on hormones secretion, enzymes activity, nerve conduction, muscle contraction and bone mineralization. Indeed, cells invest much of their energy to maintain low levels of calcium at the intracellular milieu. Calcium influx is a potent cell activator and, together with phosphate, alters electrostatic fields and proteins conformation, dictating most of signal transduction [25]. Chronic renal failure probably leads to a state of calcium toxicity [26] due to increased

intracellular calcium concentrations. It has been proposed that the mechanism for that relies on the increased PTH-mediated calcium cells influx and decreased extrusion of calcium out of the cells [27-30]. The effects of PTH on the immune function, however, are unclear. Interestingly, PTH receptors were identified on human mononuclear cells [31] and lymphocytes [32] and might increase intracellular calcium levels, leading to an increase in adenylyl cyclase activity and other unexpected effects.

Physiologically, during abrupt and sustained hypocalcemia, plasma concentrations of PTH peak at 10 minutes and decline approximately 60% of the maximum at 60 minutes [33]. Changes in extracellular calcium concentrations are detected in the parathyroid by calcium-sensing receptors (CaSRs), resulting in rapid alterations in PTH secretion. CaSRs, moreover, have been described in many other tissues, as in the thyroid (decreasing calcitonin secretion), kidneys [34], gastrointestinal tract [35], bone [36], brain [37] and skin [38]. In such a number of cell types, CaSRs have been related to a myriad of cellular processes including secretion, differentiation, proliferation, apoptosis and gene expression. CaSRs are expressed throughout the majority of the nephron and it was postulated that their role in each segment would be specific [39-41].

Vitamin D insufficiency is common in hospitalized patients [42] and has been associated with an increased risk of sepsis [43]. Besides its well established role in calcium absorption and bone homeostasis, vitamin D has been implicated in mechanisms of cell proliferation [44], cancer [45, 46] and infection [47]. Many immune cells, including macrophages, neutrophils, dendritic cells and lymphocytes express the vitamin D receptor [48], a potent inducer of LL-37, an antimicrobial peptide active against both gram-positive and gram-negative bacteria [49-52]. The active form, however, has a half-life of less than 4 hours. 25-hydroxyvitamin D with a half-life of 2 weeks is routinely used in assessing vitamin D levels [53]. Hypovitaminosis D was a major finding in our patients, independently of their renal function and group studied. Interestingly, it has

recently been shown that 1-25-dihydroxyvitamin D enhances the frequency of Foxp3(+) regulatory T cells [54]. The effects of vitamin D supplementation in critical care are currently under investigation [55-58].

An important cross-talk exists between the PTH and vitamin D pathways. PTH stimulates vitamin D hydroxylation, increasing 1-25-dihydroxyvitamin D release by kidney cells. By the other hand, vitamin D directly acts on parathyroid cells, inhibiting PTH gene expression. PTH cells, moreover, express the vitamin D receptor and produce 1- α -hydroxylase independently, allowing local vitamin D hydroxylation. Compelling evidence also suggests that 1-25-dihydroxyvitamin D regulates parathyroid calcium-sensing receptors (CaSRs) expression [59].

Parathyroid hormone increases the concentrations of extracellular calcium by stimulating renal 1- α -hydroxylase to convert 25-hydroxyvitamin D to 1, 25-dihydroxyvitamin D (calcitriol) and by stimulating bone resorption and renal calcium absorption in the distal nephron. PTH indirectly increases serum phosphate by stimulating vitamin D activation and through bone resorption. These effects are regulated by inhibiting renal phosphate reabsorption.

It has been suggested that cytokines could impair PTH secretion during sepsis [10], maybe due to increased expression of calcium-sensing receptors, which would reduce the set point for PTH suppression by extracellular calcium, leading to hypocalcemia and hypoparathyroidism. Indeed, IL-6 up regulates CaSRs gene transcription [60] and CaSRs activation itself is able to induce TNF production [61]. In the recovery phase after septic shock, we found a state of "relative" hypoparathyroidism, characterized by a significant decrease in PTH levels, despite persistent hypocalcemia. We propose, thus, that CaSRs are affected by proinflammatory cytokines levels and become deregulated in the presence of systemic inflammation (Fig. 3).

PTH levels were not enough to counter-balance hypocalcemia in ICU controls, severe sepsis and septic shock groups. In the recovery phase of patients with high creatinine

Fig. (3). Diagram exhibiting reasons for hypocalcemia in the critically ill and our proposal for the effects of PTH in septic shock.

levels, moreover, after the cytokines storm that characterizes septic shock goes by, PTH levels suddenly decrease, while persistent hypocalcemia lasts. It may be hypothesized that CaSRs function is abruptly restored, when systemic inflammation is reduced, leading to inappropriately low PTH levels. The sudden decrease in PTH levels was observed in patients with high creatinine levels, but not on patient with normal creatinine. Chronic kidney disease and dialysis therapy lead to an acquired immune dysfunction [62] and secondary hyperparathyroidism has been implicated as a possible contributing factor [63]. Indeed, the sudden decrease in PTH levels, when patients in the recovery phase were compared to those in septic shock, was evident only in patients with high creatinine levels.

Accumulation of intracellular calcium can trigger injury, might cause cardiac arrhythmias and cell death. Neutrophils of patients with elevated serum PTH levels presented defects in chemotaxis, phagocytosis and bacterial killing [64, 65]. PTH, furthermore, has been implicated in the function of lymphocytes. Indeed, some authors suggest an effect on T-lymphocyte proliferation in the presence of uremia, even though some results are inconsistent and difficult to interpret, since it is quite difficult to reproduce *in vitro*, the complex abnormalities found in uremic patients. Despite that, T cells proliferation was restored in patients with extreme high PTH levels after parathyroidectomy [66]. Several publications, moreover, have shown a dose-dependent inhibition caused by PTH on B cells proliferation and antibodies production [67].

Two types of pharmacological compounds act on CaSRs: 1) calcimimetics [68], which enhance CaSRs sensitivity to extracellular calcium and 2) calcilytics [69], which act as CaSRs antagonists. Further studies using appropriate models of sepsis to address the effects of calcimimetics and calcilytics in clinical and biochemical outcomes, in our opinion, may illuminate many points that remain unknown [70, 71].

Our study is the first to investigate both PTH and calcium levels in human sepsis at multiple time points. Actually, we only found three other studies reporting PTH levels in septic patients. One of them concludes that high PTH levels occur as a late event in sepsis-associated multiple organ failure [72]. The two others are very similar and describe high PTH levels in association to the severity of septic patients and in patients submitted to major surgery [10, 73]. Larger studies are necessary to further investigate our results in septic patients with normal and altered renal function and to dissect if uremia and proinflammatory cytokines have synergistic deleterious effects on the PTH axis.

CONCLUSIONS

We conclude that patients with high creatinine levels show a significant rise in PTH levels during septic shock, followed by a sudden decrease in the recovery phase of the disease. Serum ionized calcium levels remained low in the recovery phase and do not explain the sudden decrease in PTH secretion. Our results suggest that PTH secretion is being deregulated by the systemic inflammatory response that occurs in the critically ill and that in the recovery phase

it becomes unresponsive to low serum calcium levels. We hypothesize that PTH might have deleterious effects in sepsis, probably by inducing intracellular calcium overload. Further studies are warranted to investigate if the manipulation of CaSRs or PTH receptors affects the mortality of septic patients, as well as to firmly establish the molecular basis that underlies the expression of PTH receptors in immune cells and the mechanisms found by nature that dictate how PTH and CaSRs participate in the response to bacterial attack.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no financial or ethical conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

FPS is supported by FAPESP, São Paulo Research Foundation (grant 2009/17731-2).

ITV is supported by CNPq, National Council for Scientific and Technological Development (grant # 480109/2010-9).

The current study is part of an ongoing prospective cohort study, designed to store clinical data and biological samples for multiple projects and conceived by HPS and LMCN (BRISK Project, Brazilian Initiative for Sepsis Knowledge).

We would like to express our gratitude to the Hospital das Clínicas Central Laboratory for PTH, vitamin D and electrolytes measurements and for the nurses, residents and medical staff from the University of São Paulo Emergency Medicine Department for helping us with data and blood samples collection.

ABBREVIATIONS

CaSR	=	calcium-sensing receptors
PTH	=	parathyroid hormone
TNF	=	tumor necrosis factor
IL-6	=	interleukin-6
COPD	=	chronic obstructive pulmonary disease
HIV	=	human immunodeficiency virus
ICU	=	Intensive Care Unit
SOFA	=	Sequential Organ Failure Assessment

REFERENCES

- [1] McDermid, R.C. and Bagshaw, S.M. (2011) ICU and critical care outreach for the elderly. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, 25(3), 439-449.
- [2] Singbartl, K. and Kellum, J.A. (2012) AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes. *Kidney Int.*, 81(9), 819-825.
- [3] Arulkumaran, N., Montero, R.M. and Singer, M. (2012) Management of the dialysis patient in general intensive care. *Br. J. Anaesth.*, 108(2), 183-192.
- [4] Platani, M., Kashani, K., Cabello-Garza, J., Maldonado, F., Kashyap, R., Kor, D.J., Gajic, O. and Cartin-Ceba, R. (2011) Predictors of acute kidney injury in septic shock patients: an

- observational cohort study. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 6(7), 1744-1751.
- [5] Ricci, Z. and Ronco, C. (2009) Pathogenesis of acute kidney injury during sepsis. *Curr. Drug Targets*, 10(12), 1179-1183.
- [6] Vaziri, N.D.; Pahl, M.V.; Crum, A. and Norris, K. (2012) Effect of uremia on structure and function of immune system. *J. Ren. Nutr.*, 22(1), 149-156.
- [7] Cohen, G.; Haag-Weber, M. and Horl, W.H. (1997) Immune dysfunction in uremia. *Kidney Int. Suppl.*, 62, S79-S82.
- [8] Massry, S.G.; Niwa, T. and Rutkowski, B. (2012) Uremia research and toxicity. *J. Ren. Nutr.*, 22(1), 76.
- [9] Penido, M.G. and Alon, U.S. (2012) Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatr. Nephrol.*, 27(11), 2039-2048.
- [10] Lind, L.; Carlstedt, F.; Rastad, J.; Sternstrom, H.; Stridsberg, M.; Ljunggren, O.; Wide, L.; Larsson, A.; Hellman, P. and Ljunghall, S. (2000) Hypocalcemia and parathyroid hormone secretion in critically ill patients. *Crit. Care Med.*, 28(1), 93-99.
- [11] Watkins, R.R.; Yamshchikov, A.V.; Lemmonovich, T.L. and Salata, R.A. (2011) The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. *J. Infect.*, 63(5), 321-326.
- [12] Nakamura, Y.; Mimura, Y.; Uno, K. and Yamakawa, M. (1998) Parathyroid hormone activity increases during endotoxemia in conscious rats. *Horm. Metab. Res.*, 30(2), 88-92.
- [13] Toribio, R.E.; Kohn, C.W.; Hardy, J. and Rosol, T.J. (2005) Alterations in serum parathyroid hormone and electrolyte concentrations and urinary excretion of electrolytes in horses with induced endotoxemia. *J. Vet. Intern. Med.*, 19(2), 223-231.
- [14] Holowaychuk, M.K.; Birkenheuer, A.J.; Li, J.; Marr, H.; Boll, A. and Nordone, S.K. (2012) Hypocalcemia and hypovitaminosis D in dogs with induced endotoxemia. *J. Vet. Intern. Med.*, 26(2), 244-251.
- [15] Wichterman, K.A.; Baue, A.E. and Chaudry, I.H. (1980) Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.*, 29(2), 189-201.
- [16] Fink, M.P. and Heard, S.O. (1990) Laboratory models of sepsis and septic shock. *J. Surg. Res.*, 49(2), 186-196.
- [17] Bone, R.C.; Balk, R.A.; Cerra, F.B.; Dellinger, R.P.; Fein, A.M.; Knaus, W.A.; Schein, R.M. and Sibbald, W.J. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101(6), 1644-1655.
- [18] Levey, A.S.; Eckardt, K.U.; Tsakamoto, Y.; Levin, A.; Coresh, J.; Rossert, J.; De Zeeuw, D.; Hostetter, T.H.; Lameire, N. and Eknoyan, G. (2005) Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.*, 67(6), 2089-2100.
- [19] Zaloga, G.P. and Chernow, B. (1987) The multifactorial basis for hypocalcemia during sepsis. Studies of the parathyroid hormone-vitamin D axis. *Ann. Intern. Med.*, 107(1), 36-41.
- [20] Wu, L.; Golden, N. and Mayeux, P.R. (2007) Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18(6), 1807-1815.
- [21] Zivim, J.R.; Gooley, T.; Zager, R.A. and Ryan, M.J. (2001) Hypocalcemia: a pervasive metabolic abnormality in the critically ill. *Am. J. Kidney Dis.*, 37(4), 689-698.
- [22] Egi, M.; Kim, I.; Nichol, A.; Stachowski, E.; French, C.J.; Hart, G.K.; Hegarty, C.; Bailey, M. and Bellomo, R. (2011) Ionized calcium concentration and outcome in critical illness. *Crit. Care Med.*, 39(2), 314-321.
- [23] Forsythe, R.M.; Wessel, C.B.; Billiar, T.R.; Angus, D.C. and Rosengart, M.R. (2008) Parenteral calcium for intensive care unit patients. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2008(4), CD006163.
- [24] Dellinger, R.P.; Levy, M.M.; Carlet, J.M.; Bion, J.; Parker, M.M.; Jaeschke, R.; Reinhart, K.; Angus, D.C.; Brun-Buisson, C.; Beale, R.; et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit. Care Med.*, 36(1), 296-327.
- [25] Clapham, D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058.
- [26] Massry, S.G. and Fadda, G.Z. (1993) Chronic renal failure is a state of cellular calcium toxicity. *Am. J. Kidney Dis.*, 21(1), 81-86.
- [27] Horl, W.H.; Haag-Weber, M.; Mai, B. and Massry, S.G. (1995) Verapamil reverses abnormal $[Ca^{2+}]_i$ and carbohydrate metabolism of PMNL of dialysis patients. *Kidney Int.*, 47(6), 1741-1745.
- [28] Tanaka, H.; Smogorzewski, M.; Koss, M. and Massry, S.G. (1995) Pathways involved in PTH-induced rise in cytosolic Ca^{2+} concentration of rat renal proximal tubule. *Am. J. Physiol.*, 268(2 Pt 2), F330-F337.
- [29] Massry, S.G.; Klin, M.; Ni, Z.; Tian, J.; Kedes, L. and Smogorzewski, M. (1995) Impaired agonist-induced calcium signaling in hepatocytes from chronic renal failure rats. *Kidney Int.*, 48(4), 1324-1331.
- [30] Massry, S.G. and Smogorzewski, M. (1995) The mechanisms responsible for the PTH-induced rise in cytosolic calcium in various cells are not uniform. *Miner. Electrolyte Metab.*, 21(1-3), 13-28.
- [31] Perry, H.M. 3rd; Chappel, J.C.; Bellorin-Font, E.; Tamao, J.; Martin, K.J. and Teitelbaum, S.L. (1984) Parathyroid hormone receptors in circulating human mononuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 259(9), 5531-5535.
- [32] Bialasiewicz, A.A.; Juppner, H.; Diehl, V. and Hesch, R.D. (1979) Binding of bovine parathyroid hormone to surface receptors of cultured B-lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 584(3), 467-478.
- [33] Kumar, R. and Thompson, J.R. (2011) The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 22(2), 216-224.
- [34] Ba, J. and Friedman, P.A. (2004) Calcium-sensing receptor regulation of renal mineral ion transport. *Cell Calcium*, 35(3), 229-237.
- [35] Rutten, M.J.; Bacon, K.D.; Marink, K.L.; Stoney, M.; Meichsner, C.L.; Lee, F.P.; Hobson, S.A.; Rodland, K.D.; Sheppard, B.C.; Trunkel, D.D.; Deveney, K.E. and Deveney, C.W. (1999) Identification of a functional Ca^{2+} -sensing receptor in normal human gastric mucous epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 277(3 Pt 1), G662-G670.
- [36] Chang, W.; Tu, C.; Chen, T.H.; Bikle, D. and Shoback, D. (2008) The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Sci. Signal*, 1(35), ra1.
- [37] Washburn, D.L.; Anderson, J.W. and Ferguson, A.V. (2000) The calcium receptor modulates the hyperpolarization-activated current in subfornical organ neurons. *Neuroreport*, 11(14), 3231-3235.
- [38] Tu, C.L.; Oda, Y.; Kozmur, L. and Bikle, D.D. (2004) The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell Calcium*, 35(3), 265-273.
- [39] Magno, A.L.; Ward, B.K. and Ratajczak, T. (2011) The calcium-sensing receptor: a molecular perspective. *Endocr. Rev.*, 32(1), 3-30.
- [40] Aslanova, U.F.; Morimoto, T.; Farajov, E.I.; Kumagai, N.; Nishino, M.; Sugawara, N.; Ohsaga, A.; Maruyama, Y.; Tsuchiya, S.; Takahashi, S. and Kondo, Y. (2006) Chloride-dependent intracellular pH regulation via extracellular calcium-sensing receptor in the medullary thick ascending limb of the mouse kidney. *Tohoku J. Exp. Med.*, 210(4), 291-300.
- [41] Motoyama, H.I. and Friedman, P.A. (2002) Calcium-sensing receptor regulation of PTH-dependent calcium absorption by mouse cortical ascending limbs. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 283(3), F399-F406.
- [42] Thomas, M.K.; Lloyd-Jones, D.M.; Thadhani, R.I.; Shaw, A.C.; Deraska, D.J.; Kitch, B.T.; Vamvakas, E.C.; Dick, I.M.; Prince, R.L. and Finkelstein, J.S. (1998) Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N. Engl. J. Med.*, 338(12), 777-783.
- [43] Ginde, A.A.; Camargo, C.A. and Shapiro, N.I. (2011) Vitamin D insufficiency and sepsis severity in emergency department patients with suspected infection. *Acad. Emerg. Med.*, 18(5), 551-554.
- [44] Zehnder, D. and Hewison, M. (1999) The renal function of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase. *Mol. Cell Endocrinol.*, 151(1-2), 213-220.
- [45] Fleet, J.C.; DeSmet, M.; Johnson, R. and Li, Y. (2012) Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem. J.*, 441(1), 61-76.
- [46] Norton, R. and O'Connell, M.A. (2012) Vitamin D: potential in the prevention and treatment of lung cancer. *Anticancer Res.*, 32(1), 211-221.
- [47] Jeng, L.; Yamshchikov, A.V.; Judd, S.E.; Blumberg, H.M.; Martin, G.S.; Ziegler, T.R. and Tangpricha, V. (2009) Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J. Transl. Med.*, 7, 28.
- [48] Ma, Y.; Khalifa, B.; Yee, Y.K.; Lu, J.; Memeza, A.; Savkur, R.S.; Yamamoto, Y.; Chintalacharuvu, S.R.; Yamaoka, K.; Stayrook, K.R.; Bramlett, K.S.; Zeng, Q.Q.; Chandrasekar, S.; Yu,

- X.P.; Linebarger, J.H.; Iurria, S.J.; Burris, T.P.; Kato, S.; Chin, W.W. and Nagpal, S. (2006) Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsteroidal vitamin D receptor modulators. *J. Clin. Invest.*, 116(4), 892-904.
- [49] Liu, P.T.; Stenger, S.; Li, H.; Wenzel, L.; Tan, B.H.; Krutzik, S.R.; Ochoa, M.T.; Schaub, J.; Wu, K.; Meinken, C.; Kamen, D.L.; Wagner, M.; Bals, R.; Steinmeyer, A.; Zügel, U.; Gallo, R.L.; Eisenberg, D.; Hewison, M.; Hollis, B.W.; Adams, J.S.; Bloom, B.R. and Modlin, R.L. (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311(5768), 1770-1773.
- [50] Lagishetty, V.; Liu, N.Q. and Hewison, M. (2011) Vitamin D metabolism and innate immunity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 347(1-2), 97-105.
- [51] White, J.H. (2010) Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: past, present and future. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 121(1-2), 234-238.
- [52] Hewison, M. (2010) Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 39(2), 365-379, table of contents.
- [53] Miller, J. and Gallo, R.L. (2010) Vitamin D and innate immunity. *Dermatol. Ther.*, 23(1), 13-22.
- [54] Urry, Z.; Chambers, E.S.; Kytrakis, E.; Dimeloe, S.; Richards, D.F.; Gabrysova, L.; Christensen, J.; Gupta, A.; Saglani, S.; Bush, A. O'Garra, A.; Brown, Z. and Hawrylowicz, C.M. (2012) The role of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and cytokines in the promotion of distinct Foxp3⁺ and IL-10⁺ CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 42(10), 2697-2708.
- [55] Amrein, K.; Sourij, H.; Wagner, G.; Holl, A.; Pieber, T.R.; Smolle, K.H.; Stojakovic, T.; Schnedl, C. and Dobnig, H. (2011) Short-term effects of high-dose oral vitamin D₃ in critically ill vitamin D deficient patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Crit. Care*, 15(2), R104.
- [56] Lee, P.; Nair, P.; Eisman, J.A. and Center, J.R. (2009) Vitamin D deficiency in the intensive care unit: an invisible accomplice to morbidity and mortality? *Intensive Care Med.*, 35(12), 2028-2032.
- [57] Van den Berghe, G.; Van Rooybroeck, D.; Vanhove, P.; Wouters, P.J.; De Pourcq, L. and Bouillon, R. (2003) Bone turnover in prolonged critical illness: effect of vitamin D. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88(10), 4623-4632.
- [58] Lee, P.; Eisman, J.A. and Center, J.R. (2009) Vitamin D deficiency in critically ill patients. *N. Engl. J. Med.*, 360(18), 1912-1914.
- [59] Biennime, F.; Prie, D.; Friedlander, G. and Souberbielle, J.C. (2011) Vitamin D metabolism and activity in the parathyroid gland. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 347(1-2), 30-41.
- [60] Canaff, L. and Hendy, G.N. (2005) Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1 β . Role of the NF-kappaB PATHWAY and kappaB elements. *J. Biol. Chem.*, 280(14), 14177-14188.
- [61] Abdullah, H.I.; Pedraza, P.L.; Hao, S.; Rodland, K.D.; McGiff, J.C. and Ferreri, N.R. (2006) NFAT regulates calcium-sensing receptor-mediated TNF production. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 290(5), F1110-1117.
- [62] Pesanti, E.L. (2001) Immunologic defects and vaccination in patients with chronic renal failure. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 15(3), 813-832.
- [63] Geara, A.S.; Castellanos, M.R.; Bassil, C.; Schuller-Levis, G.; Park, E.; Smith, M.; Goldman, M. and Elsayegh, S. (2010) Effects of parathyroid hormone on immune function. *Clin. Dev. Immunol.*, 2010.
- [64] Chervu, I.; Kierszstein, M.; Alexiewicz, J.M.; Fadda, G.Z.; Smogorzewski, M. and Massry, S.G. (1992) Impaired phagocytosis in chronic renal failure is mediated by secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.*, 41(6), 1501-1505.
- [65] Salant, D.J.; Glover, A.M.; Anderson, R.; Meyers, A.M.; Rabkin, R.; Myburgh, J.A. and Rabson, A.R. (1976) Polymorphonuclear leucocyte function in chronic renal failure and after renal transplantation. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.*, 12, 370-379.
- [66] Tzanno-Martins, C.; Futato, E.; Jorgetti, V. and Duarte, A.J. (2000) Restoration of impaired T-cell proliferation after parathyroidectomy in hemodialysis patients. *Nephron*, 84(3), 224-227.
- [67] Gaciong, Z.; Alexiewicz, J.M.; Linker-Israeli, M.; Shulman, I.A.; Pitts, T.O. and Massry, S.G. Inhibition of immunoglobulin production by parathyroid hormone. Implications in chronic renal failure. *Kidney Int.*, 40(1), 96-106.
- [68] Torres, P.U. (2011) [Calcimimetics: physiology, results of preclinical and clinical studies, and perspectives]. *Nephrol. Ther.*, 7(2), 99-104.
- [69] Widler, L. (2011) Calcilytics: antagonists of the calcium-sensing receptor for the treatment of osteoporosis. *Future Med. Chem.*, 3(5), 535-547.
- [70] Davey, A.E.; Leach, K.; Valant, C.; Conigrave, A.D.; Sexton, P.M. and Christopoulos, A. (2012) Positive and negative allosteric modulators promote biased signaling at the calcium-sensing receptor. *Endocrinology*, 153(3), 1232-1241.
- [71] Ward, D.T. and Riccardi, D. (2012) New concepts in calcium-sensing receptor pharmacology and signalling. *Br. J. Pharmacol.*, 165(1), 35-48.
- [72] Lucas, C.E.; Ledgerwood, A.M.; Jeffries, C.C. and Vernier, P. (2010) Late association of hyperparathyroidism in septic patients with multiple organ failure. *Surgery*, 148(1), 135-139.
- [73] Carlstedt, F.; Lind, L.; Rastad, J.; Sjöström, H.; Wide, L. and Ljunghall, S. (1998) Parathyroid hormone and ionized calcium levels are related to the severity of illness and survival in critically ill patients. *Eur. J. Clin. Invest.*, 28(11), 898-903.

Anexo G - Pinheiro da Silva F et al. Neuropeptide downregulation in sepsis. *Inflammation*. 2014 Feb;37(1):142-5.

Neuropeptide Downregulation in Sepsis

Fabiano Pinheiro da Silva,^{1,4} Marcel Cerqueira César Machado,¹ Paulo Clemente Sallet,² Fernando Godinho Zampieri,¹ Alessandra Carvalho Goulart,³ Francisco Torggler Filho,¹ Hermes Vieira Barbeiro,¹ Irineu Tadeu Velasco,¹ Luiz Monteiro da Cruz Neto,¹ and Heraldo Possolo de Souza¹

Abstract—Neuropeptides are an extremely conserved arm of neurobiology. Despite their effects as neurohormones and neurotransmitters, a multitude of other effects have been described, putting in evidence their importance as regulators of immune responses, such as chemotaxis, oxidative burst, pro-inflammatory signaling, and many others. The effects of neuropeptides in the pathophysiology of sepsis, however, remain poorly investigated. A prospective cohort study to investigate the effects of neuropeptides in sepsis was carried out. Here, we describe that neuropeptides are downregulated during septic shock. We propose that it may be a protective mechanism of the host to avoid further inflammatory injury.

KEY WORDS: inflammation; neuropeptides; sepsis.

INTRODUCTION

Neuropeptides exert their action by binding to specific G protein-coupled receptors. Many hundreds of receptors have been identified, but some receptors remain orphans. Neuropeptides are found heterogeneously distributed throughout the brain and can be expressed on cell bodies, dendrites, and axon terminals. Perhaps most neurons in the brain contain some neuropeptide or other neuromodulator in addition to fast-acting amino acid neurotransmitters [1]. Neuropeptides modulate GABA and glutamate synaptic release and activity at post- or presynaptic sites. Many neurons contain multiple neuropeptides, which possess similar or opposing activities.

Neuropeptides have been implicated in the control of a variety of cellular processes, including thermoregulation, food and water consumption, sexual behavior, sleep, locomotion, learning, memory, and responses to stress and

pain, suggesting that they may participate in major neuropsychiatric illnesses, including septic encephalopathy.

Despite their central effects, moreover, neuropeptides are secreted by many peripheral tissues, and several recent publications suggest that they play a key role in inflammation. For that reason, we have decided to investigate the profile of six neuropeptides in sepsis: cortisol, neurotensin, substance P, α -MSH, melatonin, and oxytocin.

MATERIAL AND METHODS

Study Design. The current study was a prospective cohort, conducted in one of the Hospital das Clínicas Intensive Care Units (University of São Paulo, Brazil), and conceived as part of the BRISK Project (Brazilian Initiative for Sepsis Knowledge), launched in 2009 to investigate many molecular aspects of sepsis. Surgical patients, trauma, and coronary syndromes are usually admitted at other ICUs from our hospital, which makes our population very homogeneous. Indeed, the five following reasons account for more than 90 % of the ICU admissions included in this study: sepsis, stroke, altered level of consciousness, pulmonary edema, and asthma/COPD. Patients less than 18 years old, pregnant, with disseminated malignancies or receiving chemother-

¹ Emergency Medicine Department, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Psychiatry Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Center for Clinical Research, Hospital Universitário, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴ To whom correspondence should be addressed at Emergency Medicine Department, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. E-mail: pinheirofabiano@hotmail.com

apy, HIV-positive, with advanced hepatic disease, in end-of-life conditions, and those that refused to participate in this study were excluded. The remaining patients were divided in three groups: (1) ICU control (patients admitted to the ICU for noninfectious causes); (2) severe sepsis group (patients admitted to the ICU for severe sepsis or developed severe sepsis during the ICU stay); and (3) septic shock group (patients admitted to the ICU for septic shock or developed septic shock during the ICU stay). Data and blood samples were collected at patient's admission or when severe sepsis and septic shock were diagnosed by the medical staff. Severe sepsis and septic shock were defined as proposed in 1992 according to the ACCP/SCCM Consensus Conference Committee [2]. The protocol was approved by the Hospital das Clínicas Ethical Committee, and patients (or their close relatives)

received detailed explanations and provided written consent to be included in the study protocol.

Statistical Analysis. Continuous variables were analyzed by using analysis of variance (ANOVA). Post hoc analysis was performed using LSD test. Results were reported as mean ± standard deviation. All analyses were performed using SPSS 19.0 software. A p value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

Sepsis is the first cause of death in Critical Care Units, and the scientific community is searching for markers of disease in order to guide antimicrobial therapy and other aspects of treatment, diagnosis, and prognosis of the

Fig. 1. Serum levels of a cortisol, b neurotensin, c substance P, d oxytocin, e α -MSH, and f melatonin.

critically ill. Neuropeptides are interesting candidates, since they are secreted by neurons and participate in neuropsychiatric manifestations that are frequently found in septic encephalopathy, one of the earlier manifestations of sepsis. Furthermore, neuropeptides have immunological properties, participating in numerous aspects of immunity, including direct bacterial killing [3]. These effects put neuropeptides in a special situation, since they can be implicated in both brain pathology and systemic inflammation during sepsis. Indeed, several publications have recently described the important role played by neuropeptides in septic shock, including substance P [4], α -MSH [5], oxytocin [6], neurotensin [7], and melatonin [8], which were investigated in our study.

We found that the serum levels of neurotensin (Fig. 1b), substance P (Fig. 1c), oxytocin (Fig. 1d), and α -MSH (Fig. 1e) are significantly decreased during septic shock, compared to normal levels. In the same direction, our group recently published that LL-37, a human antimicrobial peptide, is downregulated during septic shock [9]. Interestingly, neuropeptides and antimicrobial peptides are two families of proteins that display many similarities. Both families are evolutionarily conserved, composed of small signaling peptides, and present multifaceted effector functions [10, 11]. We propose, thus, that some neuropeptides and antimicrobial peptides are downregulated during septic shock to protect the host from further systemic inflammation.

DISCUSSION

Sepsis-associated encephalopathy is a common and early manifestation of septic shock [12, 13]. Its clinical diagnosis, however, is not easy. Critically ill patients often need sedation and mechanical ventilation, factors that pose difficulties to the diagnosis of delirium. Indeed, the most appropriate delirium screening tool for this population remains controversial [14]. Neuropeptides are interesting laboratory markers, since their levels significantly decrease during septic shock and due to their biological properties. Further studies are necessary to investigate their correlation with laboratory and pathological features of sepsis-associated encephalopathy.

It is important to stress that since neuropeptides are produced by neurons and peripheral cells, the interpretation of their serum values is complex. We believe that neuropeptides promote a vicious circle, causing brain dysfunction and aggravating systemic inflammation. Further experiments are warranted to understand how

much they are implicated in septic neuropsychiatric manifestations, and the detailed molecular mechanisms to explain their systemic effects.

Our study has limitations. The sample size is not large enough to investigate the correlation of different neuropeptides and the neuropsychiatric manifestations of sepsis, such as delirium. Further studies are necessary to address if neuropeptides can be useful as biomarkers in those situations.

CONCLUSIONS

Neuropeptides are a very novel and interesting point of interest in the pathophysiology of sepsis, regarding both brain pathology and systemic inflammation. They become strong candidates as markers of disease, and many groups will certainly be attracted by their potential to elucidate crucial questions of septic encephalopathy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors have no financial or ethical conflicts of interest. FPS is supported by FAPESP, São Paulo Research Foundation (grant no. 2009/17731-2).

REFERENCES

1. van den Pol, A.N. 2012. Neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron* 76: 98–115.
2. Bone, R.C., R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, and W.J. Sibbald. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644–1655.
3. Augustyniak, D., J. Nowak, and F.T. Lundy. 2012. Direct and indirect antimicrobial activities of neuropeptides and their therapeutic potential. *Current Protein & Peptide Science* 13: 723–738.
4. Ang, S.F., S.M. Mochhala, P.A. MacAry, and M. Bhatia. 2011. Hydrogen sulfide and neurogenic inflammation in polymicrobial sepsis: Involvement of substance P and ERK-NF- κ B signaling. *PLoS One* 6: e24535.
5. Doi, K., X. Hu, P.S. Yuen, A. Leelshavanichkul, H. Yasuda, S.M. Kim, J. Schnemann, T.E. Jonassen, J. Frokier, S. Nielsen, and R.A. Star. 2008. AP214, an analogue of alpha-melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality. *Kidney International* 73: 1266–1274.
6. Oliveira-Pelegrin, G.R., F.A. Aguilá, P.J. Basso, and M.J. Rocha. 2010. Role of central NO-cGMP pathway in vasopressin and oxytocin gene expression during sepsis. *Peptides* 31: 1847–1852.
7. Piliponsky, A.M., C.C. Chen, T. Nishimura, M. Metz, E.J. Rios, P.R. Dobner, E. Wada, K. Wada, S. Zacharias, U.M.

- Mohanasundaram, J.D. Faix, M. Abrink, G. Pejler, R.G. Pearl, M. Tsai, and S.J. Galli. 2008. Neutensin increases mortality and mast cells reduce neutensin levels in a mouse model of sepsis. *Nature Medicine* 14: 392–398.
8. Srinivasan, V., M. Mohamed, and H. Kato. 2012. Melatonin in bacterial and viral infections with focus on sepsis: a review. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 6: 30–39.
9. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389–395.
10. Grimmelikhuijzen, C.J., and F. Hauser. 2012. Mini-review: The evolution of Neuropeptide signaling. *Regulatory Peptides* 177(Suppl): S6–S9.
11. Barbeiro, D.F., H.V. Barbeiro, F.G. Zampieri, M.C. Cesar Machado, F. Torggler Filho, D.M. Gomes Cunha, A.C. Goulart, I.T. Velasco, L. Monteiro da Cruz Neto, H. Possolo de Souza, and F. Pinheiro da Silva. 2013. Cathelicidin LL-37 bloodstream surveillance is down regulated during septic shock. *Microbes and Infection/Institut Pasteur* 15(5): 342–346. doi:10.1016/j.micinf.2013.01.001.
12. Adam, N., S. Kandelman, J. Mantz, F. Chretien, and T. Sharshar. 2013. Sepsis-induced brain dysfunction. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 11: 211–221.
13. Ebersold, M., T. Sharshar, and D. Annane. 2007. Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Medicine* 33: 941–950.
14. Goffin, T.E., and G.B. Young. 2012. Sepsis-associated encephalopathy. *Nature Reviews. Neurology* 8: 557–566.

Anexo H - Pinheiro da Silva F et al. HLA-A*31 como marcador de suscetibilidade genética em sepse. Rev. Bras. Ter. Intensiva, 2013 25(4):284-89.

ARTIGO ORIGINAL

Fabiano Pinheiro da Silva¹, Germano Preuhs Filho², Eduardo Finger³, Hermes Vieira Barbeiro¹, Fernando Godinho Zampieri¹, Alessandra Carvalho Goulart¹, Francisco Torggler Filho¹, Nicolas Panajotopoulos², Irineu Tadeu Velasco¹, Jorge Kali², Heraldo Possolo de Souza¹, Luiz Monteiro da Cruz Neto¹, Hécio Rodrigues²

1. Departamento de Emergências Clínicas, Universidade de São Paulo - USP - São Paulo (SP), Brasil.
2. Departamento de Imunologia, Instituto do Coração, Universidade de São Paulo - USP - São Paulo (SP), Brasil.
3. Laboratórios Salomão Zoppi - São Paulo (SP), Brasil.

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 26 de setembro de 2013
Aceito em 31 de outubro de 2013

Autor correspondente:
Fabiano Pinheiro da Silva
Departamento de Emergências Clínicas da
Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Amaldo, 455, sala 3.189
CEP: 01246-000 - São Paulo (SP), Brasil
E-mail: pinheirofabiano@hotmail.com
DOI: 10.5935/0103-507X.20130049

HLA-A*31 como marcador de suscetibilidade genética em sepse

*HLA-A*31 as a marker of genetic susceptibility to sepsis*

RESUMO

Objetivo: Haplótipos do HLA têm sido associados a muitas doenças autoimunes, mas não foi descrita qualquer associação na sepse. O objetivo desse estudo é investigar o sistema HLA como um possível marcador de suscetibilidade genética à sepse.

Métodos: Estudo prospectivo de coorte, incluindo pacientes admitidos em unidade de terapia intensiva e controles-saudáveis obtidos em lista de doadores de transplante renal. Foram excluídos pacientes abaixo dos 18 anos de idade, gestantes ou HIV positivos, pacientes com doença maligna metastática ou sob quimioterapia, pacientes com hepatopatia avançada, com condições de fim de vida.

O DNA foi extraído de sangue total, e a haplotipagem de HLA foi realizada com a tecnologia MiliPlex®.

Resultados: Foram incluídos 1.121 pacientes (1.078 doadores de rim, 20 pacientes com sepse grave e 23 pacientes admitidos por choque séptico) entre outubro de 2010 e outubro de 2012. Os participantes positivos para HLA-A*31 tiveram risco aumentado de desenvolver sepse (OR: 2,36 IC95%: 1,26-5,35). Não foi identificada outra associação significativa, quando considerado como nível de significância o valor de $p < 0,01$.

Conclusão: A expressão de HLA-A*31 está associada ao risco de desenvolvimento de sepse.

Descritores: Sepse; Antígenos HLA-A; Inflamação; Marcadores genéticos

INTRODUÇÃO

A proliferação bacteriana na corrente sanguínea desencadeia o processo inflamatório sistêmico imuno-mediado inato que caracteriza a sepse, uma síndrome com taxa de letalidade entre 20 e 50% em pacientes de terapia intensiva,⁽¹⁾ e cuja apresentação mais grave, o choque séptico, tem desafiado os profissionais da medicina por décadas. Ironicamente, no caso de sepse, a medicina pode ser uma vítima de seu próprio sucesso, já que um crescimento significativo dos modernos procedimentos invasivos realizados para salvar vidas, expõe o corpo a micro-organismos indutores de sepse. Além disso, os novos e poderosos antibióticos utilizados para combater a infecção aumentam a resistência aos fármacos, o que sustenta a letalidade da sepse.

Os haplótipos do HLA são um dos fenômenos genéticos que se associam mais fortemente com autoimunidade.⁽²⁾ Desde a primeira descrição de forte associação entre HLA-B*27 e espondilite anquilosante,⁽³⁾ muitas outras associações a doenças imunes foram descritas. Embora essas associações tenham sido amplamente estudadas e documentadas, pouco se tem progredido na compreensão da

influência de um haplótipo particular de HLA em cada doença. Alguns exemplos clássicos incluem a esclerose múltipla,⁽⁴⁾ a psoríase⁽⁵⁾ e o diabetes tipo 1.⁽⁶⁾ Contudo há algumas exceções, como o processo pelo qual a desaminação peptídica pode levar à doença celíaca,⁽⁷⁾ ou o cenário em que o mimetismo molecular, entre moléculas bacterianas e endógenas, pode produzir a doença de Lyme.⁽⁸⁾ Mais ainda, estudos recentes sugerem que a contribuição do HLA à autoimunidade pode ser poligênica.⁽⁹⁾

Além do mais, a relevância dos HLAs vem crescendo em áreas como imunização,^(10,11) antropologia⁽¹²⁾ e farmacogenômica.⁽¹³⁾ Na verdade, algumas reações adversas medicamentosas demonstraram forte associação com HLA, como as descritas para abacavir (HLA-B*5701), alopurinol (HLA-B*58) e carbamazepina (HLA-B*1502). Outras condições associadas ao sistema HLA incluem o comportamento tabagista, esquizofrenia, doença de Parkinson, narcolepsia e doença arterial coronária.⁽¹⁴⁾ O presente artigo investigou os *loci* de classes I e II de HLA como possíveis marcadores genéticos para suscetibilidade à sepse.

MÉTODOS

O presente estudo teve as características de um estudo prospectivo de coorte, realizado em uma unidade de terapia intensiva (UTI) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) e concebido como parte do projeto BRISK (sigla do inglês *Brazilian Initiative for Sepsis Knowledge*, Iniciativa Brasileira para Conhecimento da sepse), que foi lançado em 2009 para investigar diferentes aspectos moleculares da sepse. Foram incluídos, consecutivamente, todos os pacientes admitidos na unidade de estudo, uma UTI de 14 leitos, após assinatura de termo de consentimento informado. Os pacientes de trauma cirúrgico e síndrome coronária são habitualmente admitidos em UTIs específicas do hospital, não tendo sido triados para este estudo, tornando as populações dessas unidades muito homogêneas. Foram critérios de exclusão deste estudo pacientes abaixo dos 18 anos de idade, gestantes ou HIV positivos, pacientes com doença maligna metastática ou sob quimioterapia, pacientes com hepatopatia avançada, com condições de fim de vida. O grupo controle foi composto por amostras obtidas dos doadores de rim do serviço de HLA do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo. As definições utilizadas para sepse grave e choque séptico estiveram de acordo com o Consenso do *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) proposto em 1992.⁽¹⁵⁾ O grupo

controle foi constituído por doadores de transplante renal avaliados pelo Laboratório de Histocompatibilidade do Departamento de Imunologia do Instituto do Coração da USP em exames rotineiros de triagem antes da doação. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas. Além disso, os pacientes (ou seus parentes próximos) receberam explicações detalhadas sobre o estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido por escrito para inclusão no protocolo do estudo (protocolo número 1.207/09).

O DNA foi extraído de sangue total, e a halotipagem de HLA foi realizada com a tecnologia MiliPlex®.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas estatísticos *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 19.0 e *R statistical software*. Valor de $p \leq 0,01$ foi considerado estatisticamente significativo. A escolha desse nível de significância visou reduzir o risco de erro do tipo I, dado o pequeno número de pacientes incluídos no grupo de estudo.

RESULTADOS

Este estudo incluiu 1.121 pacientes (1.078 doadores de rim, 20 pacientes com sepse grave e 23 pacientes admitidos por choque séptico) que foram incluídos entre outubro de 2010 e outubro de 2012. Em nosso caso, sepse, acidente vascular cerebral (AVC), alteração dos níveis de consciência, edema pulmonar e asma/doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) foram responsáveis por mais de 90% das condições envolvidas nos pacientes incluídos neste estudo.

Foi identificada uma associação significativa entre HLA-A*31 e risco de sepse; os participantes positivos para HLA-A*31 tiveram um risco 2,36 vezes maior de desenvolver sepse do que os negativos para HLA-A*31. Não foi identificada em nossa análise qualquer outra associação significativa, quando utilizado o nível de significância de 0,01, embora a comparação da prevalência do HLA-A*30 entre o grupo séptico e os controles tenha tido valor de p limítrofe (Tabelas 1 a 5).

DISCUSSÃO

Polimorfismos genéticos classes I e II do HLA são os alelos mais fortes e consistentes para doenças autoimunes. A região do HLA fica localizada no 6p21.3 e envolve mais de 400 genes. Tecnologias de genotipagem de SNP identificaram diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que conferem um risco muito alto de autoimunidade; entretanto, um forte desequilíbrio da conexão por

Tabela 1 - Prevalência de HLA*A em pacientes sépticos e controles

HLA-A	Sepse (%)	Controle (%)	Odds ratio	Valor de p
1	5 (0,058)	185 (0,078)	0,653	0,627
2	16 (0,186)	497 (0,211)	0,778	0,676
3	7 (0,081)	216 (0,092)	0,783	0,895
11	3 (0,034)	114 (0,048)	0,636	0,751
23	3 (0,035)	123 (0,052)	0,589	0,643
24	3 (0,035)	201 (0,085)	0,361	0,144
26	5 (0,058)	76 (0,032)	1,590	0,312
29	6 (0,070)	99 (0,042)	1,464	0,328
30	9 (0,105)	168 (0,071)	1,294	0,034
31	9 (0,105)	92 (0,039)	2,364*	0,006
32	3 (0,035)	57 (0,024)	1,272	0,783
33	3 (0,035)	94 (0,040)	0,771	~1
34	2 (0,023)	22 (0,009)	2,196	0,466
66	2 (0,023)	25 (0,011)	1,933	0,564
68	8 (0,093)	128 (0,054)	1,510	0,194
74	2 (0,093)	45 (0,019)	1,074	~1
Total	86	2.142		

Resultados expressos em número (%). O percentual se refere ao número total de alelos na população analisada. * IC95% - (1,26-5,35).

Tabela 2 - Prevalência de HLA*B em pacientes sépticos e controles

HLA-B	Sepse (%)	Controle (%)	Odds ratio	Valor de p
7	4 (0,047)	163 (0,069)	0,578	0,549
8	2 (0,023)	99 (0,042)	0,476	0,561
13	2 (0,023)	42 (0,018)	1,123	~1
14	6 (0,070)	120 (0,051)	1,179	0,597
15	8 (0,093)	242 (0,103)	0,779	0,914
18	4 (0,047)	117 (0,050)	0,806	~1
27	2 (0,023)	51 (0,022)	0,924	~1
35	9 (0,105)	239 (0,101)	0,888	~1
37	1 (0,012)	24 (0,010)	0,982	~1
38	2 (0,023)	40 (0,017)	1,179	0,985
39	4 (0,047)	73 (0,031)	1,292	0,619
40	3 (0,035)	97 (0,041)	0,729	0,992
41	3 (0,035)	29 (0,012)	2,439	0,185
44	8 (0,093)	216 (0,092)	0,873	~1
45	1 (0,012)	46 (0,020)	0,512	0,902
48	1 (0,012)	13 (0,006)	1,813	0,991
50	3 (0,035)	55 (0,023)	1,286	0,740
51	9 (0,105)	183 (0,078)	1,159	0,477
53	1 (0,012)	79 (0,034)	0,298	0,417
55	1 (0,012)	23 (0,010)	1,025	~1
57	5 (0,058)	65 (0,028)	1,813	0,180
58	6 (0,070)	79 (0,034)	1,790	0,133
82	1 (0,012)	1 (0,000)	25,573	0,099
Total	86	2.096		

Tabela 3 - Prevalência de HLA*C em pacientes sépticos e controles

HLA-C	Sepse (%)	Controle (%)	Odds ratio	Valor de p
1	0 (0)	16 (0,025)	0	0,270
2	6 (0,070)	34 (0,054)	4,264	0,722
3	8 (0,093)	75 (0,119)	2,577	0,604
4	13 (0,151)	106 (0,168)	2,963	0,816
5	3 (0,035)	33 (0,052)	2,196	0,669
6	9 (0,105)	62 (0,098)	3,507	~1
7	16 (0,186)	115 (0,182)	3,361	~1
8	9 (0,105)	49 (0,078)	4,438	0,513
12	3 (0,035)	39 (0,062)	1,858	0,454
14	4 (0,047)	22 (0,035)	4,393	0,812
15	4 (0,047)	28 (0,044)	3,451	~1
16	6 (0,070)	31 (0,049)	4,676	0,579
17	3 (0,035)	13 (0,021)	5,575	0,650
18	2 (0,023)	9 (0,014)	5,369	0,864
Total	86	632		

Tabela 4 - Prevalência de HLA*DQ em pacientes sépticos e controles

HLA-DQA	Sepse (%)	Controle (%)	Odds ratio	Valor de p
1	28 (0,333)	265(0,430)	2,491	0,116
2	11 (0,131)	76 (0,123)	3,412	0,983
3	14 (0,167)	84 (0,136)	3,929	0,560
4	5 (0,060)	42 (0,068)	2,806	0,948
5	26 (0,310)	146(0,237)	4,198	0,189
6	0 (0,000)	3 (0,005)	0	~1
Total	84	616		
HLA-DQB	Sepse (%)	Controle (%)	Odds ratio	Valor de p
2	17 (0,202)	135 (0,211)	3,113	0,969
3	32 (0,381)	180 (0,281)	4,395	0,078
4	7 (0,083)	50 (0,078)	3,461	~1
5	12 (0,143)	134 (0,209)	2,214	0,199
6	16 (0,190)	141 (0,220)	2,805	0,629
Total	84	640		

meio da região HLA⁽¹⁶⁾ complica essa interpretação. Na verdade, os *loci* de classes DR e DQ demonstraram uma forte associação com uma plethora de doenças autoimunes⁽¹⁷⁾ e também comumente se encontra que HLA-A e HLA-b contribuem para risco de doença.

É mais difícil encontrar associações importantes de HLA com doenças infecciosas, pois a maioria dos agentes infecciosos pode dar lugar a múltiplos epítomos, alguns dos quais com maior chance de ativar células T com avidéz suficiente. No entanto, algumas associações são bem estabelecidas, como as para HIV, HTLV-1, malária, vírus da hepatite C, tuberculose e lepra. Como ele muito provavelmente direciona a seleção de

Tabela 5 - Prevalência de HLA*DR em pacientes sépticos e controles

HLA-DR	Sepse (%)	Controle (%)	Odds ratio	Valor de p
1	4 (0,047)	198 (0,084)	0,499	0,298
3	8 (0,093)	241 (0,102)	0,820	0,924
4	12 (0,140)	274 (0,116)	1,082	0,624
7	12 (0,140)	273 (0,116)	1,086	0,615
8	6 (0,070)	144 (0,061)	1,030	0,919
10	1 (0,012)	41 (0,017)	0,603	~1
11	12 (0,140)	258 (0,109)	1,150	0,484
12	3 (0,035)	50 (0,021)	1,483	0,632
13	12 (0,140)	277 (0,117)	1,071	0,651
14	5 (0,058)	94 (0,040)	1,315	0,571
15	8 (0,093)	231 (0,098)	0,856	~1
16	1 (0,012)	95 (0,040)	0,260	0,289
Total	84	2.176		

haplótipo, a infecção pode, em última análise, ser relacionada com a maioria das doenças associadas a HLA.

Neste estudo, encontramos uma associação significativa entre HLA-A*31 e sepse. Não é simples identificar as razões pelas quais esse haplótipo específico dita a suscetibilidade genética. São frequentemente identificados novos alelos de A*31,⁽¹⁸⁻²⁰⁾ evidenciando que esse haplótipo se encontra sob forte pressão seletiva. Entretanto, a literatura que investiga o sistema HLA na sepse explora quase que exclusivamente a expressão de HLA-DR na membrana. Efetivamente, numerosas publicações implicam baixa expressão de HLA-DR na membrana como um preditor de desenvolvimento de sepse⁽²¹⁾ e desfecho sombrio da sepse,^(22,23) tendo este se tornado o mais confiável marcador de imunossupressão adquirida na UTI.^(24,25) Em nosso estudo, contudo, a varredura genética completa do locus HLA-DR não foi capaz de encontrar qualquer alelo mais prevalente na população séptica. Assim, em nossa opinião, a baixa expressão de HLA-DR na membrana é um marcador de exaustão celular e não um locus relacionado com suscetibilidade genética.

HLA-A*31 se expressa em 5 a 10% da população mundial, sendo a expressão mais elevada observada em ameríndios brasileiros (65%) e a mais baixa na população esquimó (0%). O HLA-A*31 tem sido fortemente associado com reações adversas farmacológicas induzidas pela carbamazepina na população japonesa e reconhece um antígeno codificado por carcinoma gástrico (*signet ring cell carcinoma*).^(26,27) Na verdade, HLA-A*31 é um alvo para o desenvolvimento de vacina contra câncer.⁽²⁸⁾ É interessante que, quando realizamos uma pesquisa

BLAST para investigar esse peptídeo, encontramos uma forte similaridade com uma proteína hipotética da *Pseudomonas aeruginosa*.

Mais de mil alelos de HLA-A e HLA-B foram caracterizados. Tanto a região para encaixe para peptídeo quanto os flancos são altamente variáveis.⁽²⁹⁾ Seria interessante decifrar os peptídeos que se ligam ao HLA-A*31 e, dessa forma, desencadeariam sepse grave e choque séptico. Esses peptídeos podem ser proteínas autógenas ou não. A importância do *cross priming* na infecção bacteriana foi estudada em micro-organismos como *Listeria monocytogenes* e *Shigella*, que podem levar a um escape de fagossomo. Em contraste, *Mycobacterium tuberculosis* e *Salmonella typhimurium* puderam sobreviver com fagossomos e tiveram de sofrer processamento cruzado para iniciar respostas de CD8 dependentes de MHC-I. Células dendríticas adquirem o antígeno após pinocitose de restos de células infectadas.⁽³⁰⁾ Os pacientes do presente estudo, contudo, não tinham infecção por esses patógenos. Notavelmente, micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) responderam por mais de 90% das infecções hospitalares no presente estudo.

O sequenciamento de ligantes a HLA a partir de uma variedade de célula apresentadora de antígeno (APCs) revelou predominantemente autoantígenos encontrados na superfície dessas células ou em seus endossomos.^(31,32) Além disso, antígenos citoplasmáticos ou nucleares responderam por 10 a 30% desses peptídeos.^(33,34)

É interessante que uma grande porção de proteínas é imediatamente degradada após a síntese, em função de fatores como transcrição ou translação defeituosa, uso alternativo do padrão de leitura, falha na montagem em complexos maiores ou modificações de ubiquitina.⁽³⁵⁾

Muitas células são ligadas por junções que permitem a transferência de pequenas moléculas ou íons citosólicos para o citosol de células vizinhas. Essas moléculas e íons podem entrar na via de apresentação de antígenos das células vizinhas.⁽³⁶⁾ A maioria dos alelos HLA-B sempre carregada de peptídeos; entretanto, apenas uma parte dos alelos HLA-A e HLA-C é carregada. Foi sugerido que as moléculas de HLA que deixam de apresentar peptídeos autógenos estão mais disponíveis à chegada de peptídeos que surgem durante a infecção ou situações de estresse.⁽³⁷⁾ Observou-se que diversas proteínas do mecanismo de HLA-I se associam a fagossomos. Sugeriu-se que isso seja resultado de uma fusão de membranas do retículo endoplasmático com o fagossomo durante a fagocitose.^(38,39)

É interessante que achados recentes demonstram que além da apresentação cruzada, células T CD8⁺ podem ser ativadas por meio da transferência de complexos de peptídeo classe I de HLA a partir da superfície de células infectadas para APCs não infectados, em um processo que foi denominado "cross-dressing".⁽⁴⁰⁾ Parece que o mecanismo envolvido nesse processo é a trogocitose. Seja qual for a origem, o HLA-A*31 é um marcador interessante para suscetibilidade à sepse e pode ajudar os médicos a se orientarem no cuidado de pacientes gravemente enfermos.

Esse estudo tem como ponto forte o fato de ser o primeiro a demonstrar uma associação entre HLA-A*31 e risco de sepse. Além disso, ele incluiu como controles uma população homogênea de pacientes saudáveis, doadores de rim. Ele tem, entretanto, importantes limitações. O tamanho da amostra de pacientes sépticos foi pequeno; sim, é necessário um estudo maior para confirmar nossos dados. Além disso, não colhemos os dados demográficos dos pacientes.

É necessário que se conduzam mais investigações para investigar os mecanismos que levam a expressão de HLA-A*31 a aumentar a suscetibilidade dos pacientes à sepse. Em um futuro próximo, essa molécula pode ser um marcador útil para ajudar os médicos na identificação de pacientes com maior propensão ao desenvolvimento de infecções graves.

CONCLUSÃO

A expressão de HLA-A*31 está associada ao risco de desenvolvimento de sepse.

Contribuições dos autores

F Pinheiro da Silva e H Rodrigues planejaram a experimentação e redigiram o primeiro manuscrito. G Preuhs Filho realizou os exames. Os demais autores contribuíram para a coleta de dados e revisaram o manuscrito.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo é parte de um estudo prospectivo de coorte planejado para armazenar dados clínicos e amostras biológicas para múltiplos projetos e foi concebido por HP Souza e LM Cruz Neto (*Brazilian Initiative for Sepsis Knowledge*, Projeto BRISK).

F Pinheiro da Silva recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), bolsa número 2009/17731-2.

Gostaríamos de expressar nossa gratidão aos pacientes e seus familiares por consentirem em participar deste estudo.

Temos um débito de gratidão para com Paulo Starzynski por sua grande ajuda na análise estatística.

ABSTRACT

Objective: The HLA haplotype has been associated with many autoimmune diseases, but no associations have been described in sepsis. This study aims to investigate the HLA system as a possible marker of genetic sepsis susceptibility.

Methods: This is a prospective cohort study including patients admitted to an intensive care unit and healthy controls from a list of renal transplant donors. Patients with less 18 years of age; pregnant or HIV positive patients; those with metastatic malignancies or receiving chemotherapy; or with advanced liver disease; or with end-of-life conditions were excluded. The

DNA was extracted from the whole blood and HLA haplotypes determined using MiliPlex[®] technology.

Results: From October 2010 to October 2012, 1,121 patients were included (1,078 kidney donors, 20 patients admitted with severe sepsis and 23 with septic shock). HLA-A*31 positive subjects had increased risk of developing sepsis (OR 2.36, 95%CI 1.26-5.35). Considering a p value <0.01, no other significant association was identified.

Conclusion: HLA-A*31 expression is associated to risk of developing sepsis.

Keywords: Sepsis; HLA-A antigens; Inflammation; Genetic markers

REFERÊNCIAS

1. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1546-54.
2. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med*. 2011;365(17):1612-23.
3. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HLA-A 27. *Lancet*. 1973;1(7809):904-7.

4. Habek M, Brinar VV, Borovecki F. Genes associated with multiple sclerosis: 15 and counting. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10(7):857-61.
5. Liu Y, Helms C, Liao W, Zaba LC, Duan S, Gardner J, et al. A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet*. 2008;4(3):e1000041.
6. Viken MK, Blomhoff A, Olsson M, Akselsen HE, Pocot F, Nerup J, et al. Reproducible association with type 1 diabetes in the extended class I region of the major histocompatibility complex. *Genes Immun*. 2009;10(4):323-33.

7. Fallang LE, Bergseng E, Hotta K, Berg-Larsen A, Kim CY, Sollid LM. Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nat Immunol.* 2009;10(10):1096-101.
8. Gross D, Huber BT, Steere AC. Molecular mimicry and Lyme arthritis. *Curr Dir Autoimmun.* 2001;3:94-111.
9. International MHC and Autoimmunity Genetics Network, Rioux JD, Goyette P, Vyse TJ, Hammarström L, Fernando MM, Green T, et al. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(44):18680-5.
10. Depla E, Van der Aa A, Livingston BD, Crimi C, Allosery K, De Brabandere V, et al. Rational design of a multipeptide vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. *J Virol.* 2008;82(1):435-50.
11. Dangoor A, Lorigan P, Keilholtz U, Schadendorf D, Harris A, Ottensmeier C, et al. Clinical and immunological responses in metastatic melanoma patients vaccinated with a high-dose poly-epitope vaccine. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(6):863-73.
12. Sanchez-Mazas A, Fernandez-Viña M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, Di D, et al. Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology.* 2011;133(2):143-64.
13. Bharadwaj M, Illing P, Theodossis A, Purcell AW, Rossjohn J, McCluskey J. Drug hypersensitivity and human leukocyte antigens of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012;52:401-31.
14. Trowsdale J. The MHC, disease and selection. *Immunol Lett.* 2011;137(1-2):1-8.
15. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest.* 1992;101(6):1481-3.
16. Rai E, Wakeland EK. Genetic predisposition to autoimmunity--what have we learned? *Semin Immunol.* 2011;23(2):67-83.
17. Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC, Knight JC. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression, genetic variation and disease. *Genes Immun.* 2010;11(2):99-112.
18. Zhang WW, Li XF, Zhang X, Li JP, Li ZQ. A novel HLA-A31 allele, A*31:22, was identified by sequence-based typing. *Tissue Antigens.* 2012;80(4):380-1.
19. Ji Y, Sun Y, Liu Y, Xie J, Du K. Two novel HLA-A alleles: HLA-A*31:01:09 and HLA-A*33:30. *Tissue Antigens.* 2011;78(3):218-9.
20. Lim AH, Song SN, Lee JY, Cho NS, Kwon SY. A novel HLA-A*31 allele, A*31:57, identified by sequence-based typing. *Tissue Antigens.* 2012;79(5):386-7.
21. Gouel-Chéron A, Allaouchiche B, Guignant C, Davin F, Floccard B, Monneret G; AzuRea Group. Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. *PLoS One.* 2012;7(3):e33095.
22. Genel F, Atlihan F, Ozsu E, Ozbek E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *J Infect.* 2010;60(3):224-8.
23. Wu JF, Ma J, Chen J, Ou-Yang B, Chen MY, Li LF, et al. Changes of monocyte human leukocyte antigen-DR expression as a reliable predictor of mortality in severe sepsis. *Crit Care.* 2011;15(5):R220.
24. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med.* 2008;14(1-2):64-78.
25. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA.* 2011;306(23):2594-605.
26. Yasoshima T, Sato N, Hirata K, Kikuchi K. The mechanism of human autologous gastric signet ring cell tumor rejection by cytotoxic T lymphocytes in the possible context of HLA-A31 molecule. *Cancer.* 1995;75(6 Suppl):1484-9.
27. Suzuki K, Sahara H, Okada Y, Yasoshima T, Hirohashi Y, Nabeta Y, et al. Identification of natural antigenic peptides of a human gastric signet ring cell carcinoma recognized by HLA-A31-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1999;163(5):2783-91.
28. Takedatsu H, Shichijo S, Azuma K, Takedatsu H, Sata M, Itoh K. Detection of a set of peptide vaccine candidates for use in HLA-A31+ epithelial cancer patients. *Int J Oncol.* 2004;24(2):337-47.
29. Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J. Regulation of NKGD2 ligand gene expression. *Hum Immunol.* 2006;67(3):159-69.
30. Kurts C, Robinson BW, Knolle PA. Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):403-14.
31. Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, Shabanowitz J, Cox AL, Sakaguchi K, et al. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science.* 1992;256(5065):1817-20.
32. Zhou D, Blum JS. Presentation of cytosolic antigens via MHC class II molecules. *Immunol Res.* 2004;30(3):279-90.
33. Dongre AR, Kovats S, deRoos P, McCormack AL, Nakagawa T, Paharkova-Vatchkova V, et al. In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *Eur J Immunol.* 2001;31(5):1485-94.
34. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Müller M, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(22):7922-7.
35. Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Binnik JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature.* 2000;404(6779):770-4.
36. Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature.* 2005;434(7029):83-8.
37. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(12):823-36.
38. Guernonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature.* 2003;425(6956):397-402.
39. Ackerman AL, Kyritsis C, Tampé R, Cresswell P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12889-94.
40. Wakim LM, Bevan MJ. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature.* 2011;471(7340):629-32.

Anexo I – Pinheiro da Silva F et al. Lipid structures as biomarkers in septic shock. *Injury* (submitted)

Elsevier Editorial System(tm) for Injury
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Lipid structures as biomarkers in septic shock: A pilot study

Article Type: Original Paper

Keywords: sepsis; lipidomics; inflammation; trauma; biomarkers

Corresponding Author: Dr. Fabiano Pinheiro da Silva,

Corresponding Author's Institution: University of Sao Paulo

First Author: Fabiano Pinheiro da Silva

Order of Authors: Fabiano Pinheiro da Silva; Thais R Cataldi; Thais M de Lima; Paulo N Starzynski; Hermes V Barbeiro; Paulo Tierno; Luiz Marcelo Malbouisson; Fernando G Zampieri; Monica T Labate; Marcel C Machado; Irineu T Velasco; Heraldo P de Souza; Carlos Alberto Labate

Abstract: Sepsis is the first cause of death in Intensive Care Units (ICUs). The molecular mechanisms underlying this disease remain poorly understood and most of the time it is very difficult for the clinician to diagnose sepsis promptly, since many other inflammatory diseases, such as major trauma, present similar clinical manifestations. A reliable biomarker to identify septic patients is still lacking. The purpose of this study is to investigate lipid structures as potential biomarkers of infection in a trauma cohort. Lipidomics analysis identified many potential candidates. Lipid structures, thus, may regulate critical pathways during sepsis and serve to guide its diagnosis and treatment.

Suggested Reviewers: Michael Kirby
kirby@math.colostate.edu

Heinz Burgmann
hein.burgmann@meduniwien.ac.at

Konrad Reinhart
konrad.reinhart@med.uni-jena.de

“Lipid structures as biomarkers in septic shock: A pilot study”

Fabiano Pinheiro da Silva¹, Thais Regiani Cataldi², Thais Martins de Lima¹, Paulo Nogueira Starzynski³, Hermes Vieira Barbeiro¹, Paulo Tierno⁴, Luiz Marcelo Malbouisson⁴, Fernando Godinho Zampieri¹, Monica Teresa Veneziano Labate², Marcel Cerqueira César Machado¹, Irineu Tadeu Velasco¹, Heraldo Possolo de Souza¹ and Carlos Alberto Labate²

¹*Emergency Medicine Department, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil,* ²*Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Department of Genetics, Laboratório Multiusuários Centralizado de Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia, University of Sao Paulo, Piracicaba, Brazil,* ³*Biosciences Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil and* ⁴*Trauma Department, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil*

Corresponding author:
Fabiano Pinheiro da Silva, M.D., PhD
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 sala 3189
CEP 01246-000
São Paulo – SP – Brazil
Phone/fax: 55.11.3061.8480
e-mail: pinheirofabiano@hotmail.com

Key words: sepsis, lipidomics, inflammation, biomarkers

“Lipid structures as biomarkers in septic shock: A pilot study”

Abstract

Sepsis is the first cause of death in Intensive Care Units (ICUs). The molecular mechanisms underlying this disease remain poorly understood and most of the time it is very difficult for the clinician to diagnose sepsis promptly, since many other inflammatory diseases, such as major trauma, present similar clinical manifestations. A reliable biomarker to identify septic patients is still lacking. The purpose of this study is to investigate lipid structures as potential biomarkers of infection in a trauma cohort. Lipidomics analysis identified many potential candidates. Lipid structures, thus, may regulate critical pathways during sepsis and serve to guide its diagnosis and treatment.

Introduction

Sepsis is a complex syndrome characterized by systemic inflammation triggered by the presence of bacteria in the bloodstream. Despite the rapid administration of antibiotics, it frequently deteriorates to septic shock, a clinical scenario when patients need vasopressors to maintain adequate blood perfusion. At this moment, life support techniques, such as mechanical ventilation and hemodialysis are often necessary.

Sepsis is a world-leading cause of death and hospital-acquired infections occur in around 40% of the patients admitted to an Intensive Care Unit (ICU). Ironically, the invasive techniques that have been developed to maintain the patient alive are frequent routes where highly virulent antibiotic-resistant bacteria take to reach the bloodstream.

Trauma is the first cause of death for people ages 1-44 [1] and patients that survive the first 48-72 hours after major trauma frequently deteriorate due to nosocomial infection. The diagnosis of infection in this population is, however, challenging. As major injuries also trigger an uncontrolled inflammatory response, it is very difficult for the clinician to detect the presence of infection based on symptoms and signs such as fever, leukocytosis, heart rate or respiratory frequency. Blood cultures are frequently negative even in the presence of devastating infection and a reliable biomarker of infection is still lacking, despite exhaustive efforts directed towards this aim.

Lipids are ancient and ubiquitous molecules which participate in a myriad of cell functions. They are not only structural components of membranes and intracellular second messengers, but also serve as ligand for

receptors as well as covalently attached post-translational modification to proteins. These lipidation reactions include N-myristoylation, S-palmitoylation and prenylation. Lipids, moreover, are involved in a multitude of enzymatic processes that generate thousands of intermediate substrates which might have many unknown biological properties.

Metabolomics and lipidomics are powerful tools in systems biology capable of screening small molecules present in biological samples. Such information allows scientists to understand underlying mechanisms of a given disease. Lipidomics is a relatively recent field of research that has been driven by rapid advances in technologies such as mass spectrometry, nuclear magnetic resonance spectroscopy and computational methods [2].

The purpose of this study is to investigate lipid structures as potential biomarkers of infection in plasma samples of critically ill trauma patients.

Patients and Methods

Study design

The current study was a prospective cohort, conducted in one of the Hospital das Clinicas Intensive Care Units (University of Sao Paulo, Brazil), and conceived as part of the BRISK Project (Brazilian Initiative for Sepsis Knowledge), launched in 2009 to investigate many molecular aspects of sepsis. Blood samples from 11 male trauma patients with major injuries (Injury Severity Score ≥ 18) were collected 48 hours after admission to the ICU and sent for lipidomic analysis by mass spectrometry. All patients enrolled were more than 18 and less than 40 years old. At this time, any patient had evident signs of infection yet, as judged by the medical staff. Patients with early signs of infection, pregnant, with disseminated malignancies, HIV-positive, advanced hepatic disease, in end-of-life conditions and those that refused to participate in this study were excluded. Seven of the patients enrolled in this study did not infect during their whole ICU stay. The four remaining patients developed septic shock after 48 hours of admission, but before day 7.

Septic shock was defined, according to the *ACCP/SCCM Consensus Conference Committee* proposed in 1992 [3]. The protocol was approved by the Hospital das Clinicas Ethical Committee and patients (or their close relatives) received detailed explanations and provided written consent to be included in the study protocol.

Statistical analysis

The results were analyzed by using Principal Component Analysis (PCA). PCA is a statistical procedure

that uses an orthogonal transformation to convert a set of observations of possibly correlated variables into a set of values of linearly uncorrelated variables called components. Using this strategy we found 10 lipid structures, identified by LIPID MAPS, which can be considered potential sepsis biomarkers. Results were reported as minimum, first quartile, median, mean, third quartile and maximum. All analyses were performed using the R statistical software.

Results

The 10 lipid structures identified as possible sepsis biomarkers are: 7-bromo-5-heptynoic acid, Octadecanoic acid, Heptadecaspheganine, Dihydroxyvitamin D3 derivatives, Dihydroxycholesterol, Docosahexaenoylglutamine, Phosphocoline derivatives, Phosphoethanolamine derivatives, Glycero-3-phosphoserine derivatives and N-sphinganine-1-phospho-(1'-myo-inositol) (TABLE 1).

As the sample size is small, our conclusions are based on the analysis of the medians. While 7-bromo-5-heptynoic acid, octadecanoic acid, heptadecaspheganine, phosphocoline derivatives, glycero-3-phosphoserine derivatives and N-sphinganine-1-phospho-(1'-myo-inositol) showed higher values in the non-septic group, dihydroxyvitamin D3 derivatives, dihydroxycholesterol, docosahexaenoylglutamine and phosphoethanolamine derivatives had higher values in the septic patients.

Discussion

Trauma elicits a complex sequence of cellular cascades characterized by a multiplicity of interrelated signaling pathways [4-7]. A deep comprehension of this network is far from our reality, but recent technologies have enabled a more global view of these molecular events. High-throughput screening allows a researcher to quickly conduct millions of chemical, genetic or pharmacological tests. The results of these experiments provide valuable information about unsuspected molecules and a starting point for further investigation [8, 9].

In this study, we have identified 10 lipid structures whose concentration is different in the plasma of septic patients, when compared to not-infected controls. More important, this difference was detected very early, before the results of microbiological tests, detection of a source of infection or hemodynamic collapse. Their potential as biomarkers of infection is obvious.

Many of these structures, however, do not have a clear function in inflammation. Heptynoic acid is an unsaturated fatty acid under investigation due to its properties as nitric oxide synthase inhibitor. Octadecanoic acid, also known as stearic acid, is a saturated fatty acid and one of the most common saturated fatty acids found

in nature. In epidemiologic and clinical studies, stearic acid was found to be associated with lowered LDL cholesterol in comparison with other saturated fatty acids [10]. Heptadecaspheganine is a sphingolipid. Sphingolipids are a highly diverse category of molecules that serve not only as components of biological structures but also as regulators of numerous cell functions [11].

Interestingly, dihydroxyvitamin D3 derivatives are one of the structures identified in our study. The role of vitamin D in sepsis has been focus of exhaustive investigation by many researchers, including our group. Hypovitaminosis D is a common finding in the critically ill [12], but it remains unknown if its replacement can improve the outcome of this population.

Dihydroxycholesterol and other oxysterols are ligands to nuclear receptors and have been studied as potential biomarkers associated with neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and multiple sclerosis [13].

Docosahexaenoylglutamine is an endogenous acyl amino acid. Lipid research is uncovering the existence of a large number of heretofore unidentified acyl amino acids. Reports of several additional acyl amino acids that activate G-protein coupled receptors (e.g., N-arachidonoyl glycine, N-arachidonoyl serine) and transient receptor potential channels (e.g., N-arachidonoyl dopamine, N-acyl taurines) suggested that some or many novel acyl amino acids could serve as signaling molecules [14].

Phosphocholine is an intermediate in the synthesis of phosphatidylcholine in tissues. Phosphocholine is the resulting product of a reaction, catalyzed by choline kinase, which converts ATP and choline into phosphocholine and ADP. Phosphocholine is a molecule found, for example, in lecithin. It is also used by nematodes and human placentas as a posttranslational modification to suppress an immune response by their hosts [15]. Interestingly, it is also one of the binding targets of C-reactive protein (CRP) [16]. Thus, when a cell is damaged, CRP binds to phosphocholine, beginning the recognition and phagocytotic immunological response.

Phosphoethanolamine is an ethanolamine derivative that is used to construct sphingomyelins, a sphingolipid found in mammalian cell membranes. Phosphoserine, on the other hand, is an ester of serine and phosphoric acid. Phosphoserine is a component of many proteins as the result of posttranslational modifications. The phosphorylation of the alcohol functional group into serine to produce phosphoserine is catalyzed by various types of kinases. Finally, N-sphinganine-1-phospho-(1'-myo-inositol) is an enzyme that participates in sphingolipids metabolism.

We propose that intense efforts should be directed to better understand the role of lipids signaling during sepsis. They certainly have a critical role in the molecular events that underlie overwhelming infection.

Widespread analysis of these lipids in the routine of patients is not practical and would require the development of robust, sensitive and rapid analytical techniques. The identification of reliable biomarkers is of paramount importance. Systems biology is providing the starting point.

Conclusions

Lipid structures may regulate unexpected molecular pathways during sepsis. Their role in inflammation, immunity and infection must be investigated, as well as their potential to help clinicians in the diagnosis and treatment of devastating infections.

References

- [1] Chandran A, Hyder AA, Peek-Asa C. The global burden of unintentional injuries and an agenda for progress. *Epidemiologic reviews*. 2010;32:110-20.
- [2] Griffiths WJ, Wang Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chemical Society reviews*. 2009;38:1882-96.
- [3] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101:1644-55.
- [4] Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports medicine*. 2008;38:947-69.
- [5] Reikeras O. Immune depression in musculoskeletal trauma. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* [et al]. 2010;59:409-14.
- [6] Brochner AC, Toft P. Pathophysiology of the systemic inflammatory response after major accidental trauma. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. 2009;17:43.
- [7] Lowry SF. The evolution of an inflammatory response. *Surgical infections*. 2009;10:419-25.
- [8] Wenk MR. The emerging field of lipidomics. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4:594-610.
- [9] Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208:2581-90.
- [10] Hunter JE, Zhang J, Kris-Etherton PM. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;91:46-63.
- [11] Sullards MC, Liu Y, Chen Y, Merrill AH, Jr. Analysis of mammalian sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and tissue imaging mass spectrometry (TIMS). *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1811:838-53.

[12] Pinheiro da Silva F, Zampieri FG, Barbeiro HV, Filho FT, Goulart AC, Jorgetti V, et al. Decreased parathyroid hormone levels despite persistent hypocalcemia in patients with kidney failure recovering from septic shock. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2013;13:135-42.

[13] Griffiths WJ, Hornshaw M, Woffendin G, Baker SF, Lockhart A, Heidelberger S, et al. Discovering oxysterols in plasma: a window on the metabolome. *Journal of proteome research*. 2008;7:3602-12.

[14] Tan B, O'Dell DK, Yu YW, Monn MF, Hughes HV, Burstein S, et al. Identification of endogenous acyl amino acids based on a targeted lipidomics approach. *Journal of lipid research*. 2010;51:112-9.

[15] Lovell TM, Woods RJ, Butlin DJ, Brayley KJ, Manyonda IT, Jarvis J, et al. Identification of a novel mammalian post-translational modification, phosphocholine, on placental secretory polypeptides. *Journal of molecular endocrinology*. 2007;39:189-98.

[16] Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*. 1999;7:169-77.

Table
Click here to download Table: figures - lipidomics.pptx

Table 1

Name	Minimum		1 st . quartile		Median		Mean		3 rd . quartile		Maximum	
	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS	S
7-bromo-5-heptynoic acid	23.93	20.93	29.78	28.36	35.48	33.86	38.05	33.98	43.04	39.48	61.30	47.27
Octadecanoic acid	345.40	468.50	556.70	541.30	624.80	613.50	617.30	623.20	714.50	695.40	808.70	797.10
Heptadecaspinganine	345.40	468.50	556.70	541.30	624.80	613.50	617.30	623.20	714.50	695.40	808.70	797.10
Dihydroxyvitamin D3 derivatives	32.36	46.73	35.73	48.50	42.34	51.70	46.64	51.69	54.48	54.89	71.34	56.64
Dihydroxycholesterol	32.36	46.73	35.73	48.50	42.34	51.70	46.64	51.69	54.48	54.89	71.34	56.64
Docosahexaenoylglutamine	32.36	46.73	35.73	48.50	42.34	51.70	46.64	51.69	54.48	54.89	71.34	56.64
Phosphocoline derivatives	480.20	95.27	544.70	403.04	735.30	596.06	729.30	501.99	877.80	695.02	1044.8	720.58
Phosphoethanolamine derivatives	0.00	0.00	0.00	3.80	0.59	5.38	3.64	4.85	7.73	6.44	9.41	8.63
Glycero-3-phosphoserine derivatives	0.00	9.70	11.78	13.63	28.29	16.16	23.25	15.65	36.65	18.18	37.58	20.59
N-sphinganine-1-phospho-(1'-myo-inositol)	8.45	2.73	11.87	10.26	18.76	16.34	41.78	18.60	52.56	24.68	136.41	38.97

Table legend

- Table 1. Lipid structures levels in the plasma of non-septic (NS) and septic (S) patients.

9 Referências

1. Pinheiro da Silva F, Velasco IT. SEPSE. São Paulo: Editora Manole; 2007.
2. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. The New England journal of medicine. 2003;348(2):138-50.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. The New England journal of medicine. 2003;348(16):1546-54.
4. Bone RC. Why sepsis trials fail. JAMA : the journal of the American Medical Association. 1996;276(7):565-6.
5. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Critical care medicine. 1996;24(7):1125-8.
6. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest. 1997;112(1):235-43.
7. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. Nature. 1997;390(6658):350-1.
8. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. The Journal of infectious diseases. 2000;181(1):176-80.
9. Munford RS, Pugin J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. American journal of respiratory and critical care medicine. 2001;163(2):316-21.
10. Lederer JA, Rodrick ML, Mannick JA. The effects of injury on the adaptive immune response. Shock. 1999;11(3):153-9.
11. Damas P, Canivet JL, de Groote D, Vrindts Y, Albert A, Franchimont P, et al. Sepsis and serum cytokine concentrations. Critical care medicine. 1997;25(3):405-12.
12. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992;101(6):1644-55.
13. Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. The New England journal of medicine. 1999;340(3):207-14.
14. Debets JM, Kampmeijer R, van der Linden MP, Buurman WA, van der Linden CJ. Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. Critical care medicine. 1989;17(6):489-94.

15. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Critical care medicine*. 2000;28(4 Suppl):N3-12.
16. Pruitt JH, Welborn MB, Edwards PD, Harward TR, Seeger JW, Martin TD, et al. Increased soluble interleukin-1 type II receptor concentrations in postoperative patients and in patients with sepsis syndrome. *Blood*. 1996;87(8):3282-8.
17. Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Remick DG. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *Journal of immunology*. 1992;148(9):2724-30.
18. Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *The New England journal of medicine*. 1996;334(26):1697-702.
19. Zeni F, Freeman B, Natanson C. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Critical care medicine*. 1997;25(7):1095-100.
20. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Critical care medicine*. 1996;24(1):163-72.
21. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(4):460-7.
22. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infection and immunity*. 2002;70(3):1033-41.
23. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock*. 2001;16(2):83-96.
24. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998;282(5396):2085-8.
25. Muzio M, Mantovani A. Toll-like receptors. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000;2(3):251-5.
26. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(8):546-58.
27. Szatmary Z. Molecular biology of toll-like receptors. *General physiology and biophysics*. 2012;31(4):357-66.
28. Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends in immunology*. 2012;33(9):449-58.
29. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.

30. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010;11(5):373-84.
31. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
32. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 2011;30(1):16-34.
33. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 2006;442(7098):39-44.
34. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual review of immunology*. 2003;21:335-76.
35. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*. 2013;341(6151):1246-9.
36. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(4):2551-4.
37. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*. 2009;27:693-733.
38. Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2006;2006(357):re13.
39. Fink MP. Research: advances in cell biology relevant to critical illness. *Current opinion in critical care*. 2004;10(4):279-91.
40. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunological reviews*. 2011;243(1):136-51.
41. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821-32.
42. Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*. 2010;327(5963):296-300.
43. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology*. 2009;27:229-65.
44. Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Current opinion in immunology*. 2007;19(6):615-22.
45. Martinon F, Gaide O, Petrilli V, Mayor A, Tschopp J. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. *Seminars in immunopathology*. 2007;29(3):213-29.
46. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell death and differentiation*. 2007;14(1):10-22.

47. Tschoop J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(2):95-104.
48. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000;117(4):1162-72.
49. Barton BE. IL-6: insights into novel biological activities. *Clinical immunology and immunopathology*. 1997;85(1):16-20.
50. Zurawski G, de Vries JE. Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunology today*. 1994;15(1):19-26.
51. Mulligan MS, Warner RL, Foreback JL, Shanley TP, Ward PA. Protective effects of IL-4, IL-10, IL-12, and IL-13 in IgG immune complex-induced lung injury: role of endogenous IL-12. *Journal of immunology*. 1997;159(7):3483-9.
52. Lentsch AB, Czermak BJ, Jordan JA, Ward PA. Regulation of acute lung inflammatory injury by endogenous IL-13. *Journal of immunology*. 1999;162(2):1071-6.
53. Letterio JJ, Roberts AB. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. *Clinical immunology and immunopathology*. 1997;84(3):244-50.
54. Aizawa Y, Akita K, Tanai M, Torigoe K, Mori T, Nishida Y, et al. Cloning and expression of interleukin-18 binding protein. *FEBS letters*. 1999;445(2-3):338-42.
55. Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annual review of immunology*. 2000;18:143-64.
56. Wilson M, Seymour R, Henderson B. Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infection and immunity*. 1998;66(6):2401-9.
57. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.
58. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology*. 2000;18:217-42.
59. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annual review of immunology*. 2004;22:891-928.
60. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997;90(3):909-28.
61. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, et al. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;154(3 Pt 1):602-11.
62. Goodman RB, Strieter RM, Frevert CW, Cummings CJ, Tekamp-Olson P, Kunkel SL, et al. Quantitative comparison of C-X-C chemokines produced by endotoxin-stimulated human alveolar macrophages. *The American journal of physiology*. 1998;275(1 Pt 1):L87-95.

63. Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, et al. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *Journal of immunology*. 1999;162(4):2341-6.
64. Ness TL, Hogaboam CM, Strieter RM, Kunkel SL. Immunomodulatory role of CXCR2 during experimental septic peritonitis. *Journal of immunology*. 2003;171(7):3775-84.
65. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Lincoln PM, Strieter RM, Kunkel SL. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *Journal of immunology*. 1999;163(11):6148-54.
66. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature immunology*. 2001;2(10):947-50.
67. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annual review of immunology*. 2013;31:443-73.
68. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology*. 2010;28:445-89.
69. Pinheiro da Silva F, Nizet V. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2009;14(4):509-21.
70. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature immunology*. 2002;3(11):1033-40.
71. Mangan DF, Welch GR, Wahl SM. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *Journal of immunology*. 1991;146(5):1541-6.
72. Estaquier J, Ameisen JC. A role for T-helper type-1 and type-2 cytokines in the regulation of human monocyte apoptosis. *Blood*. 1997;90(4):1618-25.
73. Hotchkiss RS, Chang KC, Grayson MH, Tinsley KW, Dunne BS, Davis CG, et al. Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(11):6724-9.
74. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, et al. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(25):14541-6.
75. Miller J, Gallo RL. Vitamin D and innate immunity. *Dermatologic therapy*. 2010;23(1):13-22.
76. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in

- myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(9):1067-77.
77. Pinheiro da Silva F, Gallo RL, Nizet V. Differing effects of exogenous or endogenous cathelicidin on macrophage toll-like receptor signaling. *Immunology and cell biology*. 2009;87(6):496-500.
 78. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007;449(7162):564-9.
 79. Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine*. 2011;3(73):73ra19.
 80. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*. 2009;30(3):131-41.
 81. Hill DA, Artis D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annual review of immunology*. 2010;28:623-67.
 82. Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(10):776-88.
 83. Ouellette AJ. Paneth cells and innate mucosal immunity. *Current opinion in gastroenterology*. 2010;26(6):547-53.
 84. Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2002;59(1):156-70.
 85. Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF. Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*. 2005;2(9):406-15.
 86. Reilly DS, Tomassini N, Bevins CL, Zasloff M. A Paneth cell analogue in *Xenopus* small intestine expresses antimicrobial peptide genes: conservation of an intestinal host-defense system. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1994;42(6):697-704.
 87. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(5):356-68.
 88. Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P. Plant defense peptides. *Biopolymers*. 1998;47(6):479-91.
 89. Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant physiology*. 1995;108(4):1353-8.
 90. Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and comparative immunology*. 1999;23(4-5):329-44.

91. Imler JL, Bulet P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chemical immunology and allergy*. 2005;86:1-21.
92. Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*. 1981;292(5820):246-8.
93. Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology*. 2007;25:697-743.
94. Dong Y, Aguilar R, Xi Z, Warr E, Mongin E, Dimopoulos G. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS pathogens*. 2006;2(6):e52.
95. Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *The Biochemical journal*. 2012;441(1):61-76.
96. Schmid-Hempel P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual review of entomology*. 2005;50:529-51.
97. Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*. 2004;198:169-84.
98. Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annual review of immunology*. 1993;11:105-28.
99. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(9):710-20.
100. Lillard JW, Jr., Boyaka PN, Chertov O, Oppenheim JJ, McGhee JR. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(2):651-6.
101. Menendez A, Brett Finlay B. Defensins in the immunology of bacterial infections. *Current opinion in immunology*. 2007;19(4):385-91.
102. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Matsuda H, Ogawa H, Nagaoka I. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *International immunology*. 2002;14(4):421-6.
103. Lynn DJ, Lloyd AT, Fares MA, O'Farrelly C. Evidence of positively selected sites in mammalian alpha-defensins. *Molecular biology and evolution*. 2004;21(5):819-27.
104. Chromek M, Slamova Z, Bergman P, Kovacs L, Podracka L, Ehren I, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nature medicine*. 2006;12(6):636-41.
105. Menard S, Forster V, Lotz M, Gutle D, Duerr CU, Gallo RL, et al. Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(1):183-93.

106. Gallo RL, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2002;110(6):823-31.
107. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*. 2001;414(6862):454-7.
108. Bowdish DM, Davidson DJ, Speert DP, Hancock RE. The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *Journal of immunology*. 2004;172(6):3758-65.
109. Kurosaka K, Chen Q, Yarovinsky F, Oppenheim JJ, Yang D. Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. *Journal of immunology*. 2005;174(10):6257-65.
110. Tomasinsig L, Pizzirani C, Skerlavaj B, Pellegatti P, Gulinelli S, Tossi A, et al. The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(45):30471-81.
111. Zhang Z, Cherryholmes G, Chang F, Rose DM, Schraufstatter I, Shively JE. Evidence that cathelicidin peptide LL-37 may act as a functional ligand for CXCR2 on human neutrophils. *European journal of immunology*. 2009;39(11):3181-94.
112. Braff MH, Hawkins MA, Di Nardo A, Lopez-Garcia B, Howell MD, Wong C, et al. Structure-function relationships among human cathelicidin peptides: dissociation of antimicrobial properties from host immunostimulatory activities. *Journal of immunology*. 2005;174(7):4271-8.
113. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, et al. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *Journal of immunology*. 2005;175(7):4662-8.
114. Arlehamn CS, Petrilli V, Gross O, Tschopp J, Evans TJ. The role of potassium in inflammasome activation by bacteria. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(14):10508-18.
115. Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell death and differentiation*. 2007;14(9):1583-9.
116. Scheel O, Papavlassopoulos M, Blunck R, Gebert A, Hartung T, Zahringer U, et al. Cell activation by ligands of the toll-like receptor and interleukin-1 receptor family depends on the function of the large-conductance potassium channel MaxiK in human macrophages. *Infection and immunity*. 2006;74(7):4354-6.
117. Yue G, Merlin D, Selsted ME, Lencer WI, Madara JL, Eaton DC. Cryptdin 3 forms anion selective channels in cytoplasmic membranes of human embryonic kidney cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2002;282(5):G757-65.

118. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(9):1983-94.
119. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1983;57(6):1308-10.
120. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*. 1983;221(4616):1181-3.
121. White JH. Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: past, present and future. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;121(1-2):234-8.
122. Gombart AF, Saito T, Koeffler HP. Exaptation of an ancient Alu short interspersed element provides a highly conserved vitamin D-mediated innate immune response in humans and primates. *BMC genomics*. 2009;10:321.
123. Yim S, Dhawan P, Ragunath C, Christakos S, Diamond G. Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2007;6(6):403-10.
124. Carretero M, Escamez MJ, Garcia M, Duarte B, Holguin A, Retamosa L, et al. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(1):223-36.
125. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sorensen O, Borregaard N, et al. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;120(3):379-89.
126. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *Journal of immunology*. 2004;173(5):2909-12.
127. Zasloff M. Sunlight, vitamin D, and the innate immune defenses of the human skin. *The Journal of investigative dermatology*. 2005;125(5):xvi-xvii.
128. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A, et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nature medicine*. 2007;13(8):975-80.
129. Hollox EJ. Copy number variation of beta-defensins and relevance to disease. *Cytogenetic and genome research*. 2008;123(1-4):148-55.
130. Tiszlavicz Z, Szabolcs A, Takacs T, Farkas G, Kovacs-Nagy R, Szantai E, et al. Polymorphisms of beta defensins are associated with the risk of severe acute pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. 2010;10(4):483-90.

131. Tollner TL, Venners SA, Hollox EJ, Yudin AI, Liu X, Tang G, et al. A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Science translational medicine*. 2011;3(92):92ra65.
132. Hollox EJ, Huffmeier U, Zeeuwen PL, Palla R, Lascorz J, Rodijk-Olthuis D, et al. Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nature genetics*. 2008;40(1):23-5.
133. Hollox EJ. Beta-defensins and Crohn's disease: confusion from counting copies. *The American journal of gastroenterology*. 2010;105(2):360-2.
134. Fukumoto K, Nagaoka I, Yamataka A, Kobayashi H, Yanai T, Kato Y, et al. Effect of antibacterial cathelicidin peptide CAP18/LL-37 on sepsis in neonatal rats. *Pediatric surgery international*. 2005;21(1):20-4.
135. Morrison G, Kilanowski F, Davidson D, Dorin J. Characterization of the mouse beta defensin 1, Defb1, mutant mouse model. *Infection and immunity*. 2002;70(6):3053-60.
136. Langberg M, Rotem C, Fenig E, Koren R, Ravid A. Vitamin D protects keratinocytes from deleterious effects of ionizing radiation. *The British journal of dermatology*. 2009;160(1):151-61.
137. Zinser GM, Sundberg JP, Welsh J. Vitamin D(3) receptor ablation sensitizes skin to chemically induced tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2002;23(12):2103-9.
138. Weber G, Chamorro CI, Granath F, Liljegren A, Zreika S, Saidak Z, et al. Human antimicrobial protein hCAP18/LL-37 promotes a metastatic phenotype in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2009;11(1):R6.
139. Coffelt SB, Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Danka ES, Scandurro AB. Leucine leucine-37 uses formyl peptide receptor-like 1 to activate signal transduction pathways, stimulate oncogenic gene expression, and enhance the invasiveness of ovarian cancer cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2009;7(6):907-15.
140. von Haussen J, Koczulla R, Shaykhiev R, Herr C, Pinkenburg O, Reimer D, et al. The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung cancer*. 2008;59(1):12-23.
141. Hase K, Murakami M, Iimura M, Cole SP, Horibe Y, Ohtake T, et al. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2003;125(6):1613-25.
142. Bertone-Johnson ER. Vitamin D and breast cancer. *Annals of epidemiology*. 2009;19(7):462-7.
143. Kilkkinen A, Knekt P, Heliovaara M, Rissanen H, Marniemi J, Hakulinen T, et al. Vitamin D status and the risk of lung cancer: a cohort study in Finland. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2008;17(11):3274-8.

144. Abnet CC, Chen Y, Chow WH, Gao YT, Helzlsouer KJ, Le Marchand L, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D and risk of esophageal and gastric cancer: Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers. *American journal of epidemiology*. 2010;172(1):94-106.
145. Park K, Elias PM, Oda Y, Mackenzie D, Mauro T, Holleran WM, et al. Regulation of cathelicidin antimicrobial peptide expression by an endoplasmic reticulum (ER) stress signaling, vitamin D receptor-independent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(39):34121-30.
146. Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert opinion on investigational drugs*. 2006;15(8):933-46.
147. Zhang L, Scott MG, Yan H, Mayer LD, Hancock RE. Interaction of polyphemusin I and structural analogs with bacterial membranes, lipopolysaccharide, and lipid monolayers. *Biochemistry*. 2000;39(47):14504-14.
148. Coffelt SB, Scandurro AB. Tumors sound the alarmin(s). *Cancer research*. 2008;68(16):6482-5.
149. Buchau AS, Morizane S, Trowbridge J, Schaubert J, Kotol P, Bui JD, et al. The host defense peptide cathelicidin is required for NK cell-mediated suppression of tumor growth. *Journal of immunology*. 2010;184(1):369-78.
150. Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annual review of immunology*. 1991;9:457-92.
151. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annual review of immunology*. 2001;19:275-90.
152. Billadeau DD, Leibson PJ. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(2):161-8.
153. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature*. 1996;379(6563):346-9.
154. Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annual review of immunology*. 1988;6:251-81.
155. Fridman WH, Bonnerot C, Daeron M, Amigorena S, Teillaud JL, Sautes C. Structural bases of Fc gamma receptor functions. *Immunological reviews*. 1992;125:49-76.
156. van de Winkel JG, Anderson CL. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *Journal of leukocyte biology*. 1991;49(5):511-24.
157. Van Den Herik-Oudijk IE, Westerdal NA, Henriquez NV, Capel PJ, Van De Winkel JG. Functional analysis of human Fc gamma RII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes. *Journal of immunology*. 1994;152(2):574-85.
158. Sylvestre DL, Ravetch JV. A dominant role for mast cell Fc receptors in the Arthus reaction. *Immunity*. 1996;5(4):387-90.

159. Sylvestre D, Clynes R, Ma M, Warren H, Carroll MC, Ravetch JV. Immunoglobulin G-mediated inflammatory responses develop normally in complement-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(6):2385-92.
160. Shibuya A, Sakamoto N, Shimizu Y, Shibuya K, Osawa M, Hiroyama T, et al. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nature immunology*. 2000;1(5):441-6.
161. Monteiro RC, Van De Winkel JG. IgA Fc receptors. *Annual review of immunology*. 2003;21:177-204.
162. Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *The Journal of experimental medicine*. 1990;171(3):597-613.
163. Launay P, Grossetete B, Arcos-Fajardo M, Gaudin E, Torres SP, Beaudoin L, et al. Fc alpha receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-IgA complexes in patients and CD89 transgenic mice. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(11):1999-2009.
164. Herr AB, Ballister ER, Bjorkman PJ. Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human Fc alphaRI and its complex with IgA1-Fc. *Nature*. 2003;423(6940):614-20.
165. Herr AB, White CL, Milburn C, Wu C, Bjorkman PJ. Bivalent binding of IgA1 to Fc alphaRI suggests a mechanism for cytokine activation of IgA phagocytosis. *Journal of molecular biology*. 2003;327(3):645-57.
166. Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EV. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1996;104(5):321-38.
167. Morton HC, van Egmond M, van de Winkel JG. Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). *Critical reviews in immunology*. 1996;16(4):423-40.
168. Schaffer FM, Monteiro RC, Volanakis JE, Cooper MD. IgA deficiency. *Immunodeficiency reviews*. 1991;3(1):15-44.
169. Conley ME, Delacroix DL. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? *Annals of internal medicine*. 1987;106(6):892-9.
170. Quan CP, Berneman A, Pires R, Avrameas S, Bouvet JP. Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. *Infection and immunity*. 1997;65(10):3997-4004.
171. Ochsenbein AF, Zinkernagel RM. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunology today*. 2000;21(12):624-30.

172. Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, et al. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science*. 1999;286(5447):2156-9.
173. Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(12):2381-6.
174. Hellwig SM, van Spriël AB, Schellekens JF, Mooi FR, van de Winkel JG. Immunoglobulin A-mediated protection against *Bordetella pertussis* infection. *Infection and immunity*. 2001;69(8):4846-50.
175. Shen L. Receptors for IgA on phagocytic cells. *Immunologic research*. 1992;11(3-4):273-82.
176. Wolf HM, Fischer MB, Pühringer H, Samstag A, Vogel E, Eibl MM. Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- α , interleukin-6) in human monocytes. *Blood*. 1994;83(5):1278-88.
177. Wolf HM, Hauber I, Gulle H, Samstag A, Fischer MB, Ahmad RU, et al. Anti-inflammatory properties of human serum IgA: induction of IL-1 receptor antagonist and Fc α R (CD89)-mediated down-regulation of tumour necrosis factor- α (TNF- α) and IL-6 in human monocytes. *Clinical and experimental immunology*. 1996;105(3):537-43.
178. Kerr MA. The structure and function of human IgA. *The Biochemical journal*. 1990;271(2):285-96.
179. Patry C, Herbelin A, Lehuen A, Bach JF, Monteiro RC. Fc α receptors mediate release of tumour necrosis factor- α and interleukin-6 by human monocytes following receptor aggregation. *Immunology*. 1995;86(1):1-5.
180. Ferreri NR, Howland WC, Spiegelberg HL. Release of leukotrienes C4 and B4 and prostaglandin E2 from human monocytes stimulated with aggregated IgG, IgA, and IgE. *Journal of immunology*. 1986;136(11):4188-93.
181. Shen L, Collins J. Monocyte superoxide secretion triggered by human IgA. *Immunology*. 1989;68(4):491-6.
182. van Egmond M, van Garderen E, van Spriël AB, Damen CA, van Amersfoort ES, van Zandbergen G, et al. Fc α RI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nature medicine*. 2000;6(6):680-5.
183. Daeron M. Fc receptor biology. *Annual review of immunology*. 1997;15:203-34.
184. Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, Kinet JP. The Fc(ϵ)RI β subunit functions as an amplifier of Fc(ϵ)RI γ -mediated cell activation signals. *Cell*. 1996;85(7):985-95.
185. Kuster H, Thompson H, Kinet JP. Characterization and expression of the gene for the human Fc receptor gamma subunit. Definition of a new gene family. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(11):6448-52.

186. Takai T, Li M, Sylvestre D, Clynes R, Ravetch JV. FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell*. 1994;76(3):519-29.
187. Miller KL, Duchemin AM, Anderson CL. A novel role for the Fc receptor gamma subunit: enhancement of Fc gamma R ligand affinity. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(5):2227-33.
188. Kinet JP. The gamma-zeta dimers of Fc receptors as connectors to signal transduction. *Current opinion in immunology*. 1992;4(1):43-8.
189. Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, et al. The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(7):4209-20.
190. Unkeless JC, Jin J. Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Current opinion in immunology*. 1997;9(3):338-43.
191. Vivier E, Daron M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunology today*. 1997;18(6):286-91.
192. Scharenberg AM, Kinet JP. The emerging field of receptor-mediated inhibitory signaling: SHP or SHIP? *Cell*. 1996;87(6):961-4.
193. Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, Guinamard R, Kurosaki T, Ravetch JV. SHIP recruitment attenuates Fc gamma RIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity*. 1999;10(6):753-60.
194. Indik ZK, Park JG, Hunter S, Mantaring M, Schreiber AD. Molecular dissection of Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Immunology letters*. 1995;44(2-3):133-8.
195. Dietrich J, Nakajima H, Colonna M. Human inhibitory and activating Ig-like receptors which modulate the function of myeloid cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000;2(3):323-9.
196. Taylor LS, McVicar DW. Functional association of Fc epsilon RI gamma with arginine(632) of paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A3 in murine macrophages. *Blood*. 1999;94(5):1790-6.
197. Maeda A, Kurosaki M, Kurosaki T. Paired immunoglobulin-like receptor (PIR)-A is involved in activating mast cells through its association with Fc receptor gamma chain. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(5):991-5.
198. Kubagawa H, Chen CC, Ho LH, Shimada TS, Gartland L, Mashburn C, et al. Biochemical nature and cellular distribution of the paired immunoglobulin-like receptors, PIR-A and PIR-B. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(2):309-18.
199. Chen CC, Hurez V, Brockenbrough JS, Kubagawa H, Cooper MD. Paternal monoallelic expression of the paired immunoglobulin-like receptors PIR-A and PIR-B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(12):6868-72.

200. Takai T, Ono M. Activating and inhibitory nature of the murine paired immunoglobulin-like receptor family. *Immunological reviews*. 2001;181:215-22.
201. Merck E, Gaillard C, Gorman DM, Montero-Julian F, Durand I, Zurawski SM, et al. OSCAR is an FcRgamma-associated receptor that is expressed by myeloid cells and is involved in antigen presentation and activation of human dendritic cells. *Blood*. 2004;104(5):1386-95.
202. Kim N, Takami M, Rho J, Josien R, Choi Y. A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(2):201-9.
203. Merck E, de Saint-Vis B, Scuiller M, Gaillard C, Caux C, Trinchieri G, et al. Fc receptor gamma-chain activation via hOSCAR induces survival and maturation of dendritic cells and modulates Toll-like receptor responses. *Blood*. 2005;105(9):3623-32.
204. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(38):23528-31.
205. Wu Y, Suzuki-Inoue K, Satoh K, Asazuma N, Yatomi Y, Berndt MC, et al. Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling. *Blood*. 2001;97(12):3836-45.
206. Davis RS, Dennis G, Jr., Odom MR, Gibson AW, Kimberly RP, Burrows PD, et al. Fc receptor homologs: newest members of a remarkably diverse Fc receptor gene family. *Immunological reviews*. 2002;190:123-36.
207. Ravetch JV, Clynes RA. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. *Annual review of immunology*. 1998;16:421-32.
208. Clynes R, Dumitru C, Ravetch JV. Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science*. 1998;279(5353):1052-4.
209. Clynes R, Maizes JS, Guinamard R, Ono M, Takai T, Ravetch JV. Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(1):179-85.
210. Ravetch JV. Fc receptors. *Current opinion in immunology*. 1997;9(1):121-5.
211. Heyman B. Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annual review of immunology*. 2000;18:709-37.
212. Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffie C, et al. Identification of FcalphaRI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcRgamma ITAM. *Immunity*. 2005;22(1):31-42.
213. Pinheiro da Silva F, Aloulou M, Skurnik D, Benhamou M, Andremont A, Velasco IT, et al. CD16 promotes Escherichia coli sepsis through an FcR gamma inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nature medicine*. 2007;13(11):1368-74.

214. Pinheiro da Silva F, Aloulou M, Benhamou M, Monteiro RC. Inhibitory ITAMs: a matter of life and death. *Trends in immunology*. 2008;29(8):366-73.
215. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual review of microbiology*. 2000;54:641-79.
216. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
217. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology*. 2001;55:165-99.
218. Lacy DB, Stevens RC. Unraveling the structures and modes of action of bacterial toxins. *Current opinion in structural biology*. 1998;8(6):778-84.
219. Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*. 1999;284(5418):1322-8.
220. Pieters J. Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. *Current opinion in immunology*. 2001;13(1):37-44.
221. Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(5):355-66.
222. Hooper LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(5):367-74.
223. Ribet D, Cossart P. Pathogen-mediated posttranslational modifications: A re-emerging field. *Cell*. 2010;143(5):694-702.
224. Reddick LE, Alto NM. Bacteria fighting back: how pathogens target and subvert the host innate immune system. *Molecular cell*. 2014;54(2):321-8.
225. Bardoel BW, Strijp JA. Molecular battle between host and bacterium: recognition in innate immunity. *Journal of molecular recognition : JMR*. 2011;24(6):1077-86.
226. Xiao TS. Subversion of innate immune signaling through molecular mimicry. *Journal of clinical immunology*. 2010;30(5):638-42.
227. Rana RR, Zhang M, Spear AM, Atkins HS, Byrne B. Bacterial TIR-containing proteins and host innate immune system evasion. *Medical microbiology and immunology*. 2013;202(1):1-10.
228. Henderson B, Wilson M, Wren B. Are bacterial exotoxins cytokine network regulators? *Trends in microbiology*. 1997;5(11):454-8.
229. Higa N, Toma C, Nohara T, Nakasone N, Takaesu G, Suzuki T. Lose the battle to win the war: bacterial strategies for evading host inflammasome activation. *Trends in microbiology*. 2013;21(7):342-9.
230. Miajlovic H, Smith SG. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS microbiology letters*. 2014;354(1):1-9.

231. Okumura CY, Nizet V. Subterfuge and Sabotage: Evasion of Host Innate Defenses by Invasive Gram-Positive Bacterial Pathogens. *Annual review of microbiology*. 2014.
232. Norrby-Teglund A, Johansson L. Beyond the traditional immune response: bacterial interaction with phagocytic cells. *International journal of antimicrobial agents*. 2013;42 Suppl:S13-6.
233. Kim HK, Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas D. Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Current opinion in microbiology*. 2012;15(1):92-9.
234. Rosenberger CM, Brumell JH, Finlay BB. Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Current biology : CB*. 2000;10(22):R823-5.
235. Papageorgiou AC, Acharya KR. Microbial superantigens: from structure to function. *Trends in microbiology*. 2000;8(8):369-75.
236. Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Tarallo R, Della Pepa ME, D'Oriano V, et al. Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins. *Current protein & peptide science*. 2012;13(8):843-54.
237. Bebien M, Hensler ME, Davanture S, Hsu LC, Karin M, Park JM, et al. The pore-forming toxin beta hemolysin/cytolysin triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity. *PLoS pathogens*. 2012;8(7):e1002812.
238. Dhakal BK, Mulvey MA. The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell host & microbe*. 2012;11(1):58-69.
239. Justice SS, Hunstad DA. UPEC hemolysin: more than just for making holes. *Cell host & microbe*. 2012;11(1):4-5.
240. Lee MS, Kim MH, Tesh VL. Shiga toxins expressed by human pathogenic bacteria induce immune responses in host cells. *Journal of microbiology*. 2013;51(6):724-30.
241. Mukhopadhyay S, Linstedt AD. Retrograde trafficking of AB(5) toxins: mechanisms to therapeutics. *Journal of molecular medicine*. 2013;91(10):1131-41.
242. Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2013;152(1-2):2-12.
243. Odumosu O, Nicholas D, Yano H, Langridge W. AB toxins: a paradigm switch from deadly to desirable. *Toxins*. 2010;2(7):1612-45.
244. Gao LY, Kwai YA. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends in microbiology*. 2000;8(7):306-13.
245. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985;228(4705):1315-7.
246. Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods in enzymology*. 1993;217:228-57.

247. Dias-Neto E, Nunes DN, Giordano RJ, Sun J, Botz GH, Yang K, et al. Next-generation phage display: integrating and comparing available molecular tools to enable cost-effective high-throughput analysis. *PloS one*. 2009;4(12):e8338.
248. Benhar I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology advances*. 2001;19(1):1-33.
249. Azzazy HM, Highsmith WE, Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical biochemistry*. 2002;35(6):425-45.
250. Russel M. Filamentous phage assembly. *Molecular microbiology*. 1991;5(7):1607-13.
251. Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. *Chemical reviews*. 1997;97(2):391-410.
252. Mersich C, Jungbauer A. Generation of bioactive peptides by biological libraries. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2008;861(2):160-70.
253. Noren KA, Noren CJ. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods*. 2001;23(2):169-78.
254. Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Advanced drug delivery reviews*. 2006;58(15):1622-54.
255. Collas P. The current state of chromatin immunoprecipitation. *Molecular biotechnology*. 2010;45(1):87-100.
256. Furey TS. ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(12):840-52.
257. Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nature cell biology*. 2001;3(8):E190-5.
258. Dong Z, Chen Y. Transcriptomics: advances and approaches. *Science China Life sciences*. 2013;56(10):960-7.
259. Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nature genetics*. 2002;32 Suppl:496-501.
260. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(9):5116-21.
261. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*. 2000;25(1):25-9.
262. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3448-9.

263. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 2009;4(1):44-57.
264. Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, Munson G, et al. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*. 2011;477(7364):295-300.
265. Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, et al. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature genetics*. 2011;43(7):621-9.
266. Wong DJ, Nuyten DS, Regev A, Lin M, Adler AS, Segal E, et al. Revealing targeted therapy for human cancer by gene module maps. *Cancer research*. 2008;68(2):369-78.
267. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *Journal of biomedical informatics*. 2011;44(5):839-47.
268. Gruber AR, Neubock R, Hofacker IL, Washietl S. The RNAz web server: prediction of thermodynamically stable and evolutionarily conserved RNA structures. *Nucleic acids research*. 2007;35(Web Server issue):W335-8.
269. Pedersen JS, Bejerano G, Siepel A, Rosenbloom K, Lindblad-Toh K, Lander ES, et al. Identification and classification of conserved RNA secondary structures in the human genome. *PLoS computational biology*. 2006;2(4):e33.
270. Junot C, Fenaille F, Colsch B, Becher F. High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways. *Mass spectrometry reviews*. 2013.
271. Mishur RJ, Rea SL. Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: detection of biomarkers of aging and of age-related diseases. *Mass spectrometry reviews*. 2012;31(1):70-95.
272. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews*. 2007;26(1):51-78.
273. Hyotylainen T, Oresic M. Systems biology strategies to study lipidomes in health and disease. *Progress in lipid research*. 2014;55C:43-60.
274. Li L, Han J, Wang Z, Liu J, Wei J, Xiong S, et al. Mass spectrometry methodology in lipid analysis. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(6):10492-507.
275. Bou Khalil M, Hou W, Zhou H, Elisma F, Swayne LA, Blanchard AP, et al. Lipidomics era: accomplishments and challenges. *Mass spectrometry reviews*. 2010;29(6):877-929.
276. Snijder J, Heck AJ. Analytical approaches for size and mass analysis of large protein assemblies. *Annual review of analytical chemistry*. 2014;7(1):43-64.
277. Wheelock CE, Goss VM, Balgoma D, Nicholas B, Brandsma J, Skipp PJ, et al. Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases. *The European respiratory journal*. 2013;42(3):802-25.

278. Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Pasa-Tolic L. High-throughput proteomics. Annual review of analytical chemistry. 2014;7(1):427-54.
279. Zhao LS, Li Q, Guo CW, Chen XH, Bi KS. [Mass spectrometry technology and its application in analysis of biological samples]. Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica. 2012;47(2):158-62.
280. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids research. 1988;16(3):1215.
281. Ahlgrimm M, Pfreundschuh M, Kreuz M, Regitz E, Preuss KD, Bittenbring J. The impact of Fc-gamma receptor polymorphisms in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP with or without rituximab. Blood. 2011;118(17):4657-62.
282. Pinheiro da Silva F, Zampieri FG, Barbeiro HV, Filho FT, Goulart AC, Jorgetti V, et al. Decreased parathyroid hormone levels despite persistent hypocalcemia in patients with kidney failure recovering from septic shock. Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets. 2013;13(2):135-42.
283. Barbeiro DF, Barbeiro HV, Zampieri FG, Cesar Machado MC, Torggler Filho F, Gomes Cunha DM, et al. Cathelicidin LL-37 bloodstream surveillance is down regulated during septic shock. Microbes and infection / Institut Pasteur. 2013;15(5):342-6.
284. Wagner JA, Williams SA, Webster CJ. Biomarkers and surrogate end points for fit-for-purpose development and regulatory evaluation of new drugs. Clinical pharmacology and therapeutics. 2007;81(1):104-7.
285. Pinheiro da Silva F, Medeiros MC, Dos Santos AB, 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.
286. Casteels P, Tempst P. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. Biochemical and biophysical research communications. 1994;199(1):339-45.
287. Steffen H, Rieg S, Wiedemann I, Kalbacher H, Deeg M, Sahl HG, et al. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006;50(8):2608-20.
288. Mochon AB, Liu H. The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the Candida albicans surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm. PLoS pathogens. 2008;4(10):e1000190.
289. Vylkova S, Nayyar N, Li W, Edgerton M. Human beta-defensins kill Candida albicans in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(1):154-61.
290. Hsu ST, Breukink E, Tischenko E, Lutters MA, de Kruijff B, Kaptein R, et al. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. Nature structural & molecular biology. 2004;11(10):963-7.

291. Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(4):321-32.
292. Console S, Marty C, Garcia-Echeverria C, Schwendener R, Ballmer-Hofer K. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(37):35109-14.
293. Ibeas JI, Lee H, Damsz B, Prasad DT, Pardo JM, Hasegawa PM, et al. Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2000;23(3):375-83.
294. Castle M, Nazarian A, Yi SS, Tempst P. Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(46):32555-64.
295. Subbalakshmi C, Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS microbiology letters*. 1998;160(1):91-6.
296. Boman HG, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and immunity*. 1993;61(7):2978-84.
297. Morton CO, Dos Santos SC, Coote P. An amphibian-derived, cationic, alpha-helical antimicrobial peptide kills yeast by caspase-independent but AIF-dependent programmed cell death. *Molecular microbiology*. 2007;65(2):494-507.
298. Lobo DS, Pereira IB, Fragel-Madeira L, Medeiros LN, Cabral LM, Faria J, et al. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry*. 2007;46(4):987-96.
299. Chamorro CI, Weber G, Gronberg A, Pivarcsi A, Stahle M. The human antimicrobial peptide LL-37 suppresses apoptosis in keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(4):937-44.
300. Bullard RS, Gibson W, Bose SK, Belgrave JK, Eaddy AC, Wright CJ, et al. Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: new insight into its potential role in cancer. *Molecular immunology*. 2008;45(3):839-48.
301. Hoffmann MH, Bruns H, Backdahl L, Neregard P, Niederreiter B, Herrmann M, et al. The cathelicidins LL-37 and rCRAMP are associated with pathogenic events of arthritis in humans and rats. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(7):1239-48.
302. Sun CL, Zhang FZ, Li P, Bi LQ. LL-37 expression in the skin in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2011;20(9):904-11.
303. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *Journal of immunology*. 2013;191(10):4895-901.
304. Honda JR, Connick E, MaWhinney S, Chan ED, Flores SC. Plasma LL-37 correlates with vitamin D and is reduced in human immunodeficiency virus-1 infected individuals not

- receiving antiretroviral therapy. *Journal of medical microbiology*. 2014;63(Pt 7):997-1003.
305. Tangpricha V, Judd SE, Ziegler TR, Hao L, Alvarez JA, Fitzpatrick AM, et al. LL-37 Concentrations and the Relationship to Vitamin D, Immune Status, and Inflammation in HIV-Infected Children and Young Adults. *AIDS research and human retroviruses*. 2014;30(7):670-6.
306. Wang G. Database-Guided Discovery of Potent Peptides to Combat HIV-1 or Superbugs. *Pharmaceuticals*. 2013;6(6):728-58.
307. Petrov V, Funderburg N, Weinberg A, Sieg S. Human beta defensin-3 induces chemokines from monocytes and macrophages: diminished activity in cells from HIV-infected persons. *Immunology*. 2013;140(4):413-20.
308. Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, Aoki R, Gee P, Yamashita A, et al. Antimicrobial peptide LL-37 produced by HSV-2-infected keratinocytes enhances HIV infection of Langerhans cells. *Cell host & microbe*. 2013;13(1):77-86.
309. Levinson P, Kaul R, Kimani J, Ngugi E, Moses S, MacDonald KS, et al. Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition. *Aids*. 2009;23(3):309-17.
310. Bergman P, Walter-Jallow L, Broliden K, Agerberth B, Soderlund J. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Current HIV research*. 2007;5(4):410-5.
311. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006;311(5768):1770-3.
312. Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998;42(9):2206-14.
313. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(24):15258-63.
314. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infection and immunity*. 1999;67(11):6084-9.
315. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *Journal of immunology*. 2006;176(4):2455-64.
316. Brown KL, Poon GF, Birkenhead D, Pena OM, Falsafi R, Dahlgren C, et al. Host defense peptide LL-37 selectively reduces proinflammatory macrophage responses. *Journal of immunology*. 2011;186(9):5497-505.

317. Ng G, Sharma K, Ward SM, Desrosiers MD, Stephens LA, Schoel WM, et al. Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells. *Immunity*. 2008;29(5):807-18.
318. Lee CC, Sun Y, Qian S, Huang HW. Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. *Biophysical journal*. 2011;100(7):1688-96.
319. Oudhoff MJ, Blaauboer ME, Nazmi K, Scheres N, Bolscher JG, Veerman EC. The role of salivary histatin and the human cathelicidin LL-37 in wound healing and innate immunity. *Biological chemistry*. 2010;391(5):541-8.
320. Hancock RE, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature reviews Microbiology*. 2012;10(4):243-54.
321. Pfirsch-Maisonnas S, Aloulou M, Xu T, Claver J, Kanamaru Y, Tiwari M, et al. Inhibitory ITAM signaling traps activating receptors with the phosphatase SHP-1 to form polarized "inhibisome" clusters. *Science signaling*. 2011;4(169):ra24.
322. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Current opinion in hematology*. 2001;8(3):131-6.
323. Haynes L, Maue AC. Effects of aging on T cell function. *Current opinion in immunology*. 2009;21(4):414-7.
324. Maue AC, Haynes L. CD4+ T cells and immunosenescence--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(5):491-5.
325. Maue AC, Yager EJ, Swain SL, Woodland DL, Blackman MA, Haynes L. T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends in immunology*. 2009;30(7):301-5.
326. Pawelec G, Solana R, Remarque E, Mariani E. Impact of aging on innate immunity. *Journal of leukocyte biology*. 1998;64(6):703-12.
327. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Current opinion in immunology*. 2010;22(4):507-13.
328. Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends in immunology*. 2009;30(7):325-33.
329. Han D, Hosokawa T, Aoike A, Kawai K. Age-related enhancement of tumor necrosis factor (TNF) production in mice. *Mechanisms of ageing and development*. 1995;84(1):39-54.
330. Effros RB, Svoboda K, Walford RL. Influence of age and caloric restriction on macrophage IL-6 and TNF production. *Lymphokine and cytokine research*. 1991;10(5):347-51.
331. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*. 2001;29(7):1303-10.

332. Kale SS, Yende S. Effects of Aging on Inflammation and Hemostasis through the Continuum of Critical Illness. *Aging and disease*. 2011;2(6):501-11.
333. Kale S, Yende S, Kong L, Perkins A, Kellum JA, Newman AB, et al. The effects of age on inflammatory and coagulation-fibrinolysis response in patients hospitalized for pneumonia. *PloS one*. 2010;5(11):e13852.
334. Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Experimental gerontology*. 2004;39(5):687-99.
335. Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, Yamaguchi K. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infection and immunity*. 1996;64(3):769-74.
336. Turnbull IR, Wlzonek JJ, Osborne D, Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Buchman TG. Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. *Shock*. 2003;19(4):310-3.
337. Gardner ID. The effect of aging on susceptibility to infection. *Reviews of infectious diseases*. 1980;2(5):801-10.
338. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Wurzner R, et al. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *Journal of virology*. 2005;79(6):3675-83.
339. Schmaltz HN, Fried LP, Xue QL, Walston J, Leng SX, Semba RD. Chronic cytomegalovirus infection and inflammation are associated with prevalent frailty in community-dwelling older women. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2005;53(5):747-54.
340. White JC, Nelson S, Winkelstein JA, Booth FV, Jakab GJ. Impairment of antibacterial defense mechanisms of the lung by extrapulmonary infection. *The Journal of infectious diseases*. 1986;153(2):202-8.
341. Mason CM, Dobard E, Summer WR, Nelson S. Intraportal lipopolysaccharide suppresses pulmonary antibacterial defense mechanisms. *The Journal of infectious diseases*. 1997;176(5):1293-302.
342. Bradley SF, Vibhagool A, Kunkel SL, Kauffman CA. Monokine secretion in aging and protein malnutrition. *Journal of leukocyte biology*. 1989;45(6):510-4.
343. Bruley-Rosset M, Vergnon I. Interleukin-1 synthesis and activity in aged mice. *Mechanisms of ageing and development*. 1984;24(3):247-64.
344. Ershler WB, Sun WH, Binkley N, Gravenstein S, Volk MJ, Kamoske G, et al. Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine and cytokine research*. 1993;12(4):225-30.
345. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, et al. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *European journal of immunology*. 1993;23(9):2375-8.

346. Kelly E, MacRedmond RE, Cullen G, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill SJ. Community-acquired pneumonia in older patients: does age influence systemic cytokine levels in community-acquired pneumonia? *Respirology*. 2009;14(2):210-6.
347. Pinheiro da Silva F, Zampieri FG, Barbeiro DF, Barbeiro HV, Goulart AC, Torggler Filho F, et al. Septic shock in older people: a prospective cohort study. *Immunity & ageing : I & A*. 2013;10(1):21.
348. Ivady B, Beres BJ, Szabo D. Recent advances in sepsis research: novel biomarkers and therapeutic targets. *Current medicinal chemistry*. 2011;18(21):3211-25.
349. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2011;80(2):193-208.
350. Perkel JM. Visiting "noncodarnia". *BioTechniques*. 2013;54(6):301, 3-4.
351. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(3):155-9.
352. Cappell MS. Acute pancreatitis: etiology, clinical presentation, diagnosis, and therapy. *The Medical clinics of North America*. 2008;92(4):889-923, ix-x.
353. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *The Journal of pathology*. 2000;190(2):117-25.
354. Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Current opinion in investigational drugs*. 2001;2(4):496-501.
355. Coelho AM, Machado MC, Sampietre SN, Leite KR, Oliveira VL, Pinotti HW. Hepatic damage during acute pancreatitis in the rat. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1997;30(8):947-53.
356. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *Journal of clinical gastroenterology*. 2000;30(4):343-56.
357. Fan ST, Choi TK, Lai CS, Wong J. Influence of age on the mortality from acute pancreatitis. *The British journal of surgery*. 1988;75(5):463-6.
358. Fu S, Stanek A, Mueller CM, Brown NA, Huan C, Bluth MH, et al. Acute pancreatitis in aging animals: loss of pancreatitis-associated protein protection? *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(26):3379-88.
359. Ammori BJ, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, et al. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 1999;3(3):252-62.
360. Beger HG, Bittner R, Block S, Buchler M. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. *Gastroenterology*. 1986;91(2):433-8.

361. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, et al. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *The Journal of surgical research*. 2006;135(1):18-26.
362. McDermid RC, Bagshaw SM. ICU and critical care outreach for the elderly. *Best practice & research Clinical anaesthesiology*. 2011;25(3):439-49.
363. Singbartl K, Kellum JA. AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes. *Kidney international*. 2012;81(9):819-25.
364. Arulkumaran N, Montero RM, Singer M. Management of the dialysis patient in general intensive care. *British journal of anaesthesia*. 2012;108(2):183-92.
365. Plataki M, Kashani K, Cabello-Garza J, Maldonado F, Kashyap R, Kor DJ, et al. Predictors of acute kidney injury in septic shock patients: an observational cohort study. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2011;6(7):1744-51.
366. Ricci Z, Ronco C. Pathogenesis of acute kidney injury during sepsis. *Current drug targets*. 2009;10(12):1179-83.
367. Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, Norris K. Effect of uremia on structure and function of immune system. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*. 2012;22(1):149-56.
368. Cohen G, Horl WH. Immune dysfunction in uremia; an update. *Toxins*. 2012;4(11):962-90.
369. Massry SG, Niwa T, Rutkowski B. Uremia research and toxicity. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*. 2012;22(1):76.
370. Penido MG, Alon US. Phosphate homeostasis and its role in bone health. *Pediatric nephrology*. 2012;27(11):2039-48.
371. Lind L, Carlstedt F, Rastad J, Stiernstrom H, Stridsberg M, Ljunggren O, et al. Hypocalcemia and parathyroid hormone secretion in critically ill patients. *Critical care medicine*. 2000;28(1):93-9.
372. Watkins RR, Yamshchikov AV, Lemonovich TL, Salata RA. The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. *The Journal of infection*. 2011;63(5):321-6.
373. Nakamura T, Mimura Y, Uno K, Yamakawa M. Parathyroid hormone activity increases during endotoxemia in conscious rats. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 1998;30(2):88-92.
374. Toribio RE, Kohn CW, Hardy J, Rosol TJ. Alterations in serum parathyroid hormone and electrolyte concentrations and urinary excretion of electrolytes in horses with induced endotoxemia. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2005;19(2):223-31.

375. Holowaychuk MK, Birkenheuer AJ, Li J, Marr H, Boll A, Nordone SK. Hypocalcemia and hypovitaminosis D in dogs with induced endotoxemia. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2012;26(2):244-51.
376. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *The Journal of surgical research*. 1980;29(2):189-201.
377. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *The Journal of surgical research*. 1990;49(2):186-96.
378. Zaloga GP, Chernow B. The multifactorial basis for hypocalcemia during sepsis. Studies of the parathyroid hormone-vitamin D axis. *Annals of internal medicine*. 1987;107(1):36-41.
379. Wu L, Gokden N, Mayeux PR. Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(6):1807-15.
380. Zivin JR, Gooley T, Zager RA, Ryan MJ. Hypocalcemia: a pervasive metabolic abnormality in the critically ill. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2001;37(4):689-98.
381. Egi M, Kim I, Nichol A, Stachowski E, French CJ, Hart GK, et al. Ionized calcium concentration and outcome in critical illness. *Critical care medicine*. 2011;39(2):314-21.
382. Forsythe RM, Wessel CB, Billiar TR, Angus DC, Rosengart MR. Parenteral calcium for intensive care unit patients. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2008(4):CD006163.
383. 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. *Critical care medicine*. 2013;41(2):580-637.
384. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 1995;80(2):259-68.
385. Massry SG, Fadda GZ. Chronic renal failure is a state of cellular calcium toxicity. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1993;21(1):81-6.
386. Horl WH, Haag-Weber M, Mai B, Massry SG. Verapamil reverses abnormal $[Ca^{2+}]_i$ and carbohydrate metabolism of PMNL of dialysis patients. *Kidney international*. 1995;47(6):1741-5.
387. Tanaka H, Smogorzewski M, Koss M, Massry SG. Pathways involved in PTH-induced rise in cytosolic Ca^{2+} concentration of rat renal proximal tubule. *The American journal of physiology*. 1995;268(2 Pt 2):F330-7.
388. Massry SG, Klin M, Ni Z, Tian J, Kedes L, Smogorzewski M. Impaired agonist-induced calcium signaling in hepatocytes from chronic renal failure rats. *Kidney international*. 1995;48(4):1324-31.

389. Massry SG, Smogorzewski M. The mechanisms responsible for the PTH-induced rise in cytosolic calcium in various cells are not uniform. *Mineral and electrolyte metabolism*. 1995;21(1-3):13-28.
390. Perry HM, 3rd, Chappel JC, Bellorin-Font E, Tamao J, Martin KJ, Teitelbaum SL. Parathyroid hormone receptors in circulating human mononuclear leukocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1984;259(9):5531-5.
391. Bialasiewicz AA, Juppner H, Diehl V, Hesch RD. Binding of bovine parathyroid hormone to surface receptors of cultured B-lymphocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 1979;584(3):467-78.
392. Kumar R, Thompson JR. The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(2):216-24.
393. Ba J, Friedman PA. Calcium-sensing receptor regulation of renal mineral ion transport. *Cell calcium*. 2004;35(3):229-37.
394. Rutten MJ, Bacon KD, Marlink KL, Stoney M, Meichsner CL, Lee FP, et al. Identification of a functional Ca²⁺-sensing receptor in normal human gastric mucous epithelial cells. *The American journal of physiology*. 1999;277(3 Pt 1):G662-70.
395. Chang W, Tu C, Chen TH, Bikle D, Shoback D. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Science signaling*. 2008;1(35):ra1.
396. Washburn DL, Anderson JW, Ferguson AV. The calcium receptor modulates the hyperpolarization-activated current in subfornical organ neurons. *Neuroreport*. 2000;11(14):3231-5.
397. Tu CL, Oda Y, Komuves L, Bikle DD. The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell calcium*. 2004;35(3):265-73.
398. Magno AL, Ward BK, Ratajczak T. The calcium-sensing receptor: a molecular perspective. *Endocrine reviews*. 2011;32(1):3-30.
399. Aslanova UF, Morimoto T, Farajov EI, Kumagai N, Nishino M, Sugawara N, et al. Chloride-dependent intracellular pH regulation via extracellular calcium-sensing receptor in the medullary thick ascending limb of the mouse kidney. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2006;210(4):291-300.
400. Motoyama HI, Friedman PA. Calcium-sensing receptor regulation of PTH-dependent calcium absorption by mouse cortical ascending limbs. *American journal of physiology Renal physiology*. 2002;283(3):F399-406.
401. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *The New England journal of medicine*. 1998;338(12):777-83.
402. Ginde AA, Camargo CA, Jr., Shapiro NI. Vitamin D insufficiency and sepsis severity in emergency department patients with suspected infection. *Academic emergency*

medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine. 2011;18(5):551-4.

403. Zehnder D, Hewison M. The renal function of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase. *Molecular and cellular endocrinology*. 1999;151(1-2):213-20.
404. Norton R, O'Connell MA. Vitamin D: potential in the prevention and treatment of lung cancer. *Anticancer research*. 2012;32(1):211-21.
405. Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, et al. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *Journal of translational medicine*. 2009;7:28.
406. Ma Y, Khalifa B, Yee YK, Lu J, Memezawa A, Savkur RS, et al. Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(4):892-904.
407. Lagishetty V, Liu NQ, Hewison M. Vitamin D metabolism and innate immunity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011;347(1-2):97-105.
408. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2012;38(1):125-39.
409. Urry Z, Chambers ES, Xystrakis E, Dimeloe S, Richards DF, Gabrysova L, et al. The role of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines in the promotion of distinct Foxp3+ and IL-10+ CD4+ T cells. *European journal of immunology*. 2012;42(10):2697-708.
410. Amrein K, Sourij H, Wagner G, Holl A, Pieber TR, Smolle KH, et al. Short-term effects of high-dose oral vitamin D3 in critically ill vitamin D deficient patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Critical care*. 2011;15(2):R104.
411. Lee P, Nair P, Eisman JA, Center JR. Vitamin D deficiency in the intensive care unit: an invisible accomplice to morbidity and mortality? *Intensive care medicine*. 2009;35(12):2028-32.
412. Van den Berghe G, Van Roosbroeck D, Vanhove P, Wouters PJ, De Pourcq L, Bouillon R. Bone turnover in prolonged critical illness: effect of vitamin D. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(10):4623-32.
413. Lee P, Eisman JA, Center JR. Vitamin D deficiency in critically ill patients. *The New England journal of medicine*. 2009;360(18):1912-4.
414. Benaïme F, Prie D, Friedlander G, Souberbielle JC. Vitamin D metabolism and activity in the parathyroid gland. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011;347(1-2):30-41.
415. Canaff L, Hendy GN. Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta. Role of the NF-kappaB PATHWAY and kappaB elements. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(14):14177-88.
416. Abdullah HI, Pedraza PL, Hao S, Rodland KD, McGiff JC, Ferreri NR. NFAT regulates calcium-sensing receptor-mediated TNF production. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006;290(5):F1110-7.

417. Pesanti EL. Immunologic defects and vaccination in patients with chronic renal failure. *Infectious disease clinics of North America*. 2001;15(3):813-32.
418. Geara AS, Castellanos MR, Bassil C, Schuller-Levis G, Park E, Smith M, et al. Effects of parathyroid hormone on immune function. *Clinical & developmental immunology*. 2010;2010.
419. Chervu I, Kiersztejn M, Alexiewicz JM, Fadda GZ, Smogorzewski M, Massry SG. Impaired phagocytosis in chronic renal failure is mediated by secondary hyperparathyroidism. *Kidney international*. 1992;41(6):1501-5.
420. Salant DJ, Glover AM, Anderson R, Meyers AM, Rabkin R, Myburgh JA, et al. Polymorphonuclear leucocyte function in chronic renal failure and after renal transplantation. *Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association European Dialysis and Transplant Association*. 1976;12:370-9.
421. Tzanno-Martins C, Futata E, Jorgetti V, Duarte AJ. Restoration of impaired T-cell proliferation after parathyroidectomy in hemodialysis patients. *Nephron*. 2000;84(3):224-7.
422. Gaciong Z, Alexiewicz JM, Linker-Israeli M, Shulman IA, Pitts TO, Massry SG. Inhibition of immunoglobulin production by parathyroid hormone. Implications in chronic renal failure. *Kidney international*. 1991;40(1):96-106.
423. Torres PU. [Calcimimetics: physiology, results of preclinical and clinical studies, and perspectives]. *Nephrologie & therapeutique*. 2011;7(2):99-104.
424. Widler L. Calcilytics: antagonists of the calcium-sensing receptor for the treatment of osteoporosis. *Future medicinal chemistry*. 2011;3(5):535-47.
425. Ward DT, Riccardi D. New concepts in calcium-sensing receptor pharmacology and signalling. *British journal of pharmacology*. 2012;165(1):35-48.
426. Lucas CE, Ledgerwood AM, Jeffries CC, Vernier P. Late association of hyperparathyroidism in septic patients with multiple organ failure. *Surgery*. 2010;148(1):135-9.
427. Carlstedt F, Lind L, Rastad J, Stjernstrom H, Wide L, Ljunghall S. Parathyroid hormone and ionized calcium levels are related to the severity of illness and survival in critically ill patients. *European journal of clinical investigation*. 1998;28(11):898-903.
428. Mawanda F, Wallace R. Can Infections Cause Alzheimer's Disease? *Epidemiologic reviews*. 2013.
429. Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM, Matte-Martyn A, Diaz-Granados N, Al-Saidi F, et al. One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine*. 2003;348(8):683-93.
430. Angus DC, Carlet J, Brussels Roundtable P. Surviving intensive care: a report from the 2002 Brussels Roundtable. *Intensive care medicine*. 2003;29(3):368-77.

431. Semmler A, Widmann CN, Okulla T, Urbach H, Kaiser M, Widman G, et al. Persistent cognitive impairment, hippocampal atrophy and EEG changes in sepsis survivors. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2013;84(1):62-9.
432. Sharshar T, Hopkinson NS, Orlikowski D, Annane D. Science review: The brain in sepsis-culprit and victim. *Critical care*. 2005;9(1):37-44.
433. Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Critical care medicine*. 2009;37(10 Suppl):S331-6.
434. Sharshar T, Bozza F, Chretien F. Neuropathological processes in sepsis. *Lancet neurology*. 2014;13(6):534-6.
435. Sonnevile R, Verdonk F, Rauturier C, Klein IF, Wolff M, Annane D, et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. *Annals of intensive care*. 2013;3(1):15.
436. Adam N, Kandelman S, Mantz J, Chretien F, Sharshar T. Sepsis-induced brain dysfunction. Expert review of anti-infective therapy. 2013;11(2):211-21.
437. Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Critical care medicine*. 2000;28(8):3019-24.
438. Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, Brouland JP, Hopkinson NS, Francoise G. The neuropathology of septic shock. *Brain pathology*. 2004;14(1):21-33.
439. Sharshar T, Gray F, Poron F, Raphael JC, Gajdos P, Annane D. Multifocal necrotizing leukoencephalopathy in septic shock. *Critical care medicine*. 2002;30(10):2371-5.
440. Terborg C, Schummer W, Albrecht M, Reinhart K, Weiller C, Rother J. Dysfunction of vasomotor reactivity in severe sepsis and septic shock. *Intensive care medicine*. 2001;27(7):1231-4.
441. Bowton DL, Bertels NH, Prough DS, Stump DA. Cerebral blood flow is reduced in patients with sepsis syndrome. *Critical care medicine*. 1989;17(5):399-403.
442. Maekawa T, Fujii Y, Sadamitsu D, Yokota K, Soejima Y, Ishikawa T, et al. Cerebral circulation and metabolism in patients with septic encephalopathy. *The American journal of emergency medicine*. 1991;9(2):139-43.
443. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England journal of medicine*. 1995;332(20):1351-62.
444. Messaris E, Memos N, Chatzigianni E, Konstadoulakis MM, Menenakos E, Katsaragakis S, et al. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Critical care medicine*. 2004;32(8):1764-70.
445. Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeu A, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet*. 2003;362(9398):1799-805.

446. Hannestad J, Gallezot JD, Schafbauer T, Lim K, Kloczynski T, Morris ED, et al. Endotoxin-induced systemic inflammation activates microglia: [(1)(1)C]PBR28 positron emission tomography in nonhuman primates. *NeuroImage*. 2012;63(1):232-9.
447. Lee YB, Nagai A, Kim SU. Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *Journal of neuroscience research*. 2002;69(1):94-103.
448. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, et al. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PloS one*. 2010;5(3):e9505.
449. Welling MM, Nabuurs RJ, van der Weerd L. Potential role of antimicrobial peptides in the early onset of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2014.
450. Bu XL, Yao XQ, Jiao SS, Zeng F, Liu YH, Xiang Y, et al. A study on the association between infectious burden and Alzheimer's disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2014.
451. Miklossy J. Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert reviews in molecular medicine*. 2011;13:e30.
452. Cocuzza CE, Piazza F, Musumeci R, Oggioni D, Andreoni S, Gardinetti M, et al. Quantitative detection of epstein-barr virus DNA in cerebrospinal fluid and blood samples of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *PloS one*. 2014;9(4):e94497.
453. Augustyniak D, Nowak J, Lundy FT. Direct and indirect antimicrobial activities of neuropeptides and their therapeutic potential. *Current protein & peptide science*. 2012;13(8):723-38.
454. Pinheiro da Silva F, Machado MC, Velasco IT. Neuropeptides in sepsis: from brain pathology to systemic inflammation. *Peptides*. 2013;44:135-8.
455. Ang SF, Moolchhala SM, MacAry PA, Bhatia M. Hydrogen sulfide and neurogenic inflammation in polymicrobial sepsis: involvement of substance P and ERK-NF-kappaB signaling. *PloS one*. 2011;6(9):e24535.
456. Doi K, Hu X, Yuen PS, Leelahavanichkul A, Yasuda H, Kim SM, et al. AP214, an analogue of alpha-melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality. *Kidney international*. 2008;73(11):1266-74.
457. Oliveira-Pelegrin GR, Aguila FA, Basso PJ, Rocha MJ. Role of central NO-cGMP pathway in vasopressin and oxytocin gene expression during sepsis. *Peptides*. 2010;31(10):1847-52.
458. Piliponsky AM, Chen CC, Nishimura T, Metz M, Rios EJ, Dobner PR, et al. Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nature medicine*. 2008;14(4):392-8.

459. Srinivasan V, Mohamed M, Kato H. Melatonin in bacterial and viral infections with focus on sepsis: a review. Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery. 2012;6(1):30-9.
460. van den Pol AN. Neuropeptide transmission in brain circuits. Neuron. 2012;76(1):98-115.
461. Pinheiro da Silva F, Cesar Machado MC, Sallet PC, Zampieri FG, Goulart AC, Torggler Filho F, et al. Neuropeptide downregulation in sepsis. Inflammation. 2014;37(1):142-5.
462. Grimmlikhuijzen CJ, Hauser F. Mini-review: the evolution of neuropeptide signaling. Regulatory peptides. 2012;177 Suppl:S6-9.
463. Rollins-Smith LA, Doersam JK, Longcore JE, Taylor SK, Shamblin JC, Carey C, et al. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. Developmental and comparative immunology. 2002;26(1):63-72.
464. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 2002;415(6870):389-95.
465. Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. Shock. 2005;24(4):300-12.
466. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. Nature. 2005;437(7061):1032-7.
467. Kumpf O, Schumann RR. Genetic influence on bloodstream infections and sepsis. International journal of antimicrobial agents. 2008;32 Suppl 1:S44-50.
468. Baehner RL, Nathan DG. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. Science. 1967;155(3764):835-6.
469. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. Archives of internal medicine. 2002;162(9):1028-32.
470. Gao L, Flores C, Fan-Ma S, Miller EJ, Moitra J, Moreno L, et al. Macrophage migration inhibitory factor in acute lung injury: expression, biomarker, and associations. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine. 2007;150(1):18-29.
471. Medvedev AE, Lentschat A, Kuhns DB, Blanco JC, Salkowski C, Zhang S, et al. Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. The Journal of experimental medicine. 2003;198(4):521-31.
472. Brookes AJ. The essence of SNPs. Gene. 1999;234(2):177-86.
473. Clark MF, Baudouin SV. A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. Intensive care medicine. 2006;32(11):1706-12.

474. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *The New England journal of medicine*. 2011;365(17):1612-23.
475. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HLA-A 27. *Lancet*. 1973;1(7809):904-7.
476. Habek M, Brinar VV, Borovecki F. Genes associated with multiple sclerosis: 15 and counting. *Expert review of molecular diagnostics*. 2010;10(7):857-61.
477. Liu Y, Helms C, Liao W, Zaba LC, Duan S, Gardner J, et al. A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS genetics*. 2008;4(3):e1000041.
478. Viken MK, Blomhoff A, Olsson M, Akselsen HE, Pociot F, Nerup J, et al. Reproducible association with type 1 diabetes in the extended class I region of the major histocompatibility complex. *Genes and immunity*. 2009;10(4):323-33.
479. Fallang LE, Bergseng E, Hotta K, Berg-Larsen A, Kim CY, Sollid LM. Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nature immunology*. 2009;10(10):1096-101.
480. Gross D, Huber BT, Steere AC. Molecular mimicry and Lyme arthritis. *Current directions in autoimmunity*. 2001;3:94-111.
481. International MHC, Autoimmunity Genetics N, Rioux JD, Goyette P, Vyse TJ, Hammarstrom L, et al. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(44):18680-5.
482. Depla E, Van der Aa A, Livingston BD, Crimi C, Allosery K, De Brabandere V, et al. Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. *Journal of virology*. 2008;82(1):435-50.
483. Dangoor A, Lorigan P, Keilholz U, Schadendorf D, Harris A, Ottensmeier C, et al. Clinical and immunological responses in metastatic melanoma patients vaccinated with a high-dose poly-epitope vaccine. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2010;59(6):863-73.
484. Sanchez-Mazas A, Fernandez-Vina M, Middleton D, Hollenbach JA, Buhler S, Di D, et al. Immunogenetics as a tool in anthropological studies. *Immunology*. 2011;133(2):143-64.
485. Bharadwaj M, Illing P, Theodossis A, Purcell AW, Rossjohn J, McCluskey J. Drug hypersensitivity and human leukocyte antigens of the major histocompatibility complex. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2012;52:401-31.
486. Trowsdale J. The MHC, disease and selection. *Immunology letters*. 2011;137(1-2):1-8.
487. Rai E, Wakeland EK. Genetic predisposition to autoimmunity--what have we learned? *Seminars in immunology*. 2011;23(2):67-83.

488. Zhang WW, Li XF, Zhang X, Li JP, Li ZQ. A novel HLA-A31 allele, A*31:22, was identified by sequence-based typing. *Tissue antigens*. 2012;80(4):380-1.
489. Ji Y, Sun Y, Liu Y, Xie J, Du K. Two novel HLA-A alleles: HLA-A*31:01:09 and HLA-A*33:30. *Tissue antigens*. 2011;78(3):218-9.
490. Lim AH, Song SN, Lee JY, Cho NS, Kwon SY. A novel HLA-A*31 allele, A*31:57, identified by sequence-based typing. *Tissue antigens*. 2012;79(5):386-7.
491. Gouel-Cheron A, Allaouchiche B, Guignant C, Davin F, Floccard B, Monneret G, et al. Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. *PloS one*. 2012;7(3):e33095.
492. Genel F, Atlihan F, Ozsu E, Ozbek E. Monocyte HLA-DR expression as predictor of poor outcome in neonates with late onset neonatal sepsis. *The Journal of infection*. 2010;60(3):224-8.
493. Wu JF, Ma J, Chen J, Ou-Yang B, Chen MY, Li LF, et al. Changes of monocyte human leukocyte antigen-DR expression as a reliable predictor of mortality in severe sepsis. *Critical care*. 2011;15(5):R220.
494. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Molecular medicine*. 2008;14(1-2):64-78.
495. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2011;306(23):2594-605.
496. Peters M, Petros A, Dixon G, Inwald D, Klein N. Acquired immunoparalysis in paediatric intensive care: prospective observational study. *Bmj*. 1999;319(7210):609-10.
497. Volk HD, Reinke P, Docke WD. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chemical immunology*. 2000;74:162-77.
498. Antoniadou CG, Wendon J, Vergani D. Paralyzed monocytes in acute on chronic liver disease. *Journal of hepatology*. 2005;42(2):163-5.
499. Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and adverse outcomes from critical illness. *Pediatric clinics of North America*. 2008;55(3):647-68, xi.
500. Monneret G, Venet F, Kullberg BJ, Netea MG. ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections. *Medical mycology*. 2011;49 Suppl 1:S17-23.
501. Giamarellos-Bourboulis EJ. What is the pathophysiology of the septic host upon admission? *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36 Suppl 2:S2-5.
502. Tschoeke SK, Ertel W. Immunoparalysis after multiple trauma. *Injury*. 2007;38(12):1346-57.

503. Yasoshima T, Sato N, Hirata K, Kikuchi K. The mechanism of human autologous gastric signet ring cell tumor rejection by cytotoxic T lymphocytes in the possible context of HLA-A31 molecule. *Cancer*. 1995;75(6 Suppl):1484-9.
504. Suzuki K, Sahara H, Okada Y, Yasoshima T, Hirohashi Y, Nabeta Y, et al. Identification of natural antigenic peptides of a human gastric signet ring cell carcinoma recognized by HLA-A31-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Journal of immunology*. 1999;163(5):2783-91.
505. Takedatsu H, Shichijo S, Azuma K, Takedatsu H, Sata M, Itoh K. Detection of a set of peptide vaccine candidates for use in HLA-A31+ epithelial cancer patients. *International journal of oncology*. 2004;24(2):337-47.
506. Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J. Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Human immunology*. 2006;67(3):159-69.
507. Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, Shabanowitz J, Cox AL, Sakaguchi K, et al. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science*. 1992;256(5065):1817-20.
508. Zhou D, Blum JS. Presentation of cytosolic antigens via MHC class II molecules. *Immunologic research*. 2004;30(3):279-90.
509. Dongre AR, Kovats S, deRoos P, McCormack AL, Nakagawa T, Paharkova-Vatchkova V, et al. In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *European journal of immunology*. 2001;31(5):1485-94.
510. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Muller M, et al. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(22):7922-7.
511. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*. 2000;404(6779):770-4.
512. Wakim LM, Bevan MJ. Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature*. 2011;471(7340):629-32.
513. Chandran A, Hyder AA, Peek-Asa C. The global burden of unintentional injuries and an agenda for progress. *Epidemiologic reviews*. 2010;32(1):110-20.
514. Griffiths WJ, Wang Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chemical Society reviews*. 2009;38(7):1882-96.
515. Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports medicine*. 2008;38(11):947-69.
516. Reikeras O. Immune depression in musculoskeletal trauma. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2010;59(6):409-14.

517. Brochner AC, Toft P. Pathophysiology of the systemic inflammatory response after major accidental trauma. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. 2009;17:43.
518. Lowry SF. The evolution of an inflammatory response. *Surgical infections*. 2009;10(5):419-25.
519. Wenk MR. The emerging field of lipidomics. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(7):594-610.
520. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(13):2581-90.
521. Hunter JE, Zhang J, Kris-Etherton PM. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*. 2010;91(1):46-63.
522. Sullards MC, Liu Y, Chen Y, Merrill AH, Jr. Analysis of mammalian sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and tissue imaging mass spectrometry (TIMS). *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1811(11):838-53.
523. Griffiths WJ, Hornshaw M, Woffendin G, Baker SF, Lockhart A, Heidelberger S, et al. Discovering oxysterols in plasma: a window on the metabolome. *Journal of proteome research*. 2008;7(8):3602-12.
524. Tan B, O'Dell DK, Yu YW, Monn MF, Hughes HV, Burstein S, et al. Identification of endogenous acyl amino acids based on a targeted lipidomics approach. *Journal of lipid research*. 2010;51(1):112-9.
525. Lovell TM, Woods RJ, Butlin DJ, Brayley KJ, Manyonda IT, Jarvis J, et al. Identification of a novel mammalian post-translational modification, phosphocholine, on placental secretory polypeptides. *Journal of molecular endocrinology*. 2007;39(3):189-98.
526. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*. 1999;7(2):169-77.