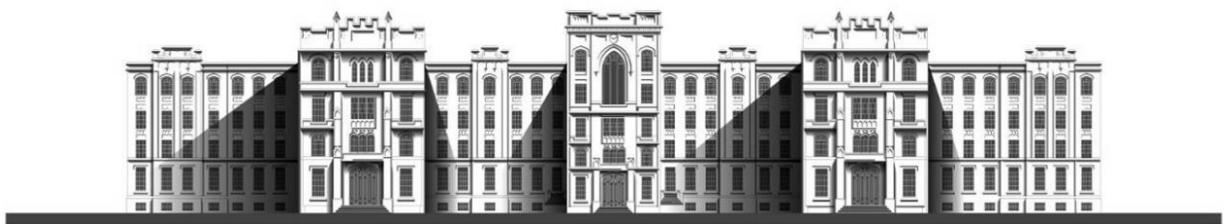


**EWERTON VINÍCIUS MACARINI BRUZAFERRO**

**Investigação do eixo cérebro-intestinal em camundongos deficientes em CRAMP submetidos a um modelo experimental de sepse**



São Paulo  
2024

**EWERTON VINÍCIUS MACARINI BRUZAFERRO**

**Investigação do eixo cérebro-intestinal em camundongos deficientes em CRAMP submetidos a um modelo experimental de sepse**

**Versão Corrigida.**

**A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Processos Imunes e Infeciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro da Silva

São Paulo  
2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bruzaferro, Ewerton Vinícius Macarini

Investigação do eixo cérebro-intestinal em camundongos deficientes em CRAMP submetidos a um modelo experimental de sepse / Ewerton Vinícius Macarini Bruzaferro; Fabiano Pinheiro da Silva, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infecciosos. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Catelicidina 2. CRAMP 3. Sepse 4. Microbiota  
5. Peptídeos antimicrobianos 6. Disbiose I. Silva, Fabiano Pinheiro da, orient II. Título

USP/FM/DBD-062/24

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

***Às pequenas criaturas  
que habitam os cantos escuros e silenciosos,  
cujos passos são quase inaudíveis e,  
cujas presenças muitas vezes passa despercebida,  
mas cuja contribuição para os seres vivos é imensurável:***

***aos camundongos,  
gratidão eterna por sua influência discreta,  
mas vital, em nossas vidas.***

## Agradecimentos

Agradeço imensamente ao **Dr. Fabiano Pinheiro da Silva**, por ter me cedido a oportunidade em conduzir este trabalho tão importante e desafiador para a compreensão da sepse. Pelas conversas, orientações e confiança que se deram por todos esses anos, mesmo em um contexto de adversidades e pandemia. Minha sincera gratidão e admiração.

Aos meus pais, **José Carlos Bruzaferro** e **Lourdes Fatima Macarini**, por serem um excelente exemplo de superação e resiliência, base hoje de minha personalidade. Pelo amor, carinho, conselhos e todo suporte necessário para que eu conseguisse seguir meus objetivos e sempre dar um passo além, tanto como profissional e ser humano.

Aos meus irmãos, **Valéria Cristiane Bruzaferro** e **Vander Eduardo Bruzaferro**, por apesar da distância, sempre estarem disponíveis a me ajudar e aconselhar em todos os momentos em que precisei.

Ao meu grande amor, **Caroline dos Santos Fontes**, por estar ao meu lado desde o início de todo este percurso e me apoiar de maneira irrestrita. Pelo amor, carinho, companheirismo e paciência. Por ter sido meu suporte psicológico e emocional durante toda a pandemia de COVID-19 e não me deixar desanimar e desistir de meus objetivos. Serei eternamente grato.

À **Suely Kubo Ariga**, por me auxiliar e me ensinar a base necessária para que eu conseguisse desenvolver este projeto no laboratório, sempre me salvando nos momentos de necessidade.

À **Thais Martins de Lima**, por sempre estar presente e ser um suporte fundamental durante todo o desenvolvimento deste projeto, analisando e discutindo experimentos, tanto como novas possibilidades e ideias. Pelas conversas descontraídas e por ter sido um dos pilares principais para a conclusão deste projeto.

Ao casal **Denise Frediani Barbeiro** e **Hermes Vieira Barbeiro** pelos grande ensinamentos e aulas que tive durante esta jornada. Por todo auxílio e conversas descontraídas e auxílios em diversas atividades laboratoriais.

À **Kelli Gouvea** e ao **Geraldo Sobrinho** por todo suporte concedido nas mais diferentes questões relacionadas ao laboratório e a FMUSP e ao **Heraldo Possolo da Silva** pelas conversas descontraídas tarde da noite.

Aos meus queridos colegas de equipe e laboratório, **Ismael Perez Flores, Lucy Medeiros, Alana Bazán, Rafael Abadessa, Beatriz Cermaria** e **Neuza** por todos os momentos de descontração e conversas construtivas que me mantiveram forte e motivado para que este estudo fosse concluído. Muito obrigado pelos risos, simpatia, amizade e companheirismo durante todo este percurso.

À **Angélica** e a **Rose** por toda a simpatia desde que entrei na FMUSP e por terem me auxiliado com toda documentação e todo o percurso burocrático em diversos momentos.

Aos **Camundongos**, por terem sido parte essencial deste projeto. Vidas preciosas que são gentilmente cedidas para o desenvolvimento científico. Vidas estas necessárias ao avanço da compreensão da saúde e do meio ambiente, vislumbrando um mundo melhor para todos os seres que caminham por este planeta. Meus agradecimentos mais profundos.

À **FAPESP, CAPES** e a **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, por fornecerem todo o auxílio financeiro e estrutural para o desenvolvimento deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

*“The mind, once stretched by a new idea, never returns to its original dimensions.”*  
– Ralph Waldo Emerson

## Normatização Adotada

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

- Referências: adaptador do *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

- Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Fredd, Maria F. Crestana, Marinalva de Sousa Araújo, Suely de Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

- Abreviação dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.



## RESUMO

Bruzaferro EVM. Investigação do eixo cérebro-intestinal em camundongos deficientes em CRAMP submetidos a um modelo experimental de sepse [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

A microbiota, o epitélio e a mucosa intestinal são linhas de defesa essenciais contra patógenos, toxinas e antígenos externos. A disbiose favorece o prevaletimento e a translocação de patógenos para a corrente sanguínea através das barreiras do trato gastrointestinal, gerando uma desregulação do sistema imunológico. Tal desregulação pode acarretar sepse, devido a uma resposta imunológica sistêmica exacerbada, que dissemina a inflamação pelo organismo e causa danos graves a diferentes órgãos, incluindo ao cérebro, um órgão imunologicamente privilegiado. Os peptídeos antimicrobianos compõem parte do sistema imune inato e são essenciais para combater infecções. Dentre eles, a expressão da catelicidina LL-37/CRAMP durante o choque séptico é reduzida, enquanto durante infecções leves, sua expressão é aumentada. Esta característica pró- e anti-inflamatória indica sua relevância em condições clínicas diferentes e sua compreensão se faz necessária para elucidar etapas cruciais da progressão da sepse. O objetivo deste trabalho foi analisar a resposta inflamatória em camundongos knockout para o gene *Camp*, submetidos a um modelo experimental de sepse. Foi avaliado o dano em tecido cerebral e o impacto na microbiota intestinal de camundongos. Observamos um aumento da expressão gênica de S100A8 e S100A9 no córtex pré-frontal em animais *wild-type* se comparado com animais *CRAMP-knockout*, como uma tendência de aumento no hipocampo e no cerebelo, o que não foi refletido na concentração final de proteínas. Houve também um aumento expressivo na população de *Escherichia coli*, *Lactobacillus spp.* e *Enterococcus faecalis* em animais *wild-type* 24 horas após a CLP se comparados ao grupo *CRAMP-knockout*. Nossos dados sugerem que a ausência do peptídeo CRAMP refletiu no retardo da progressão da sepse.

Palavras-chave: Catelicidina. CRAMP. Sepse. Microbiota. Peptídeos antimicrobianos. Disbiose.

## ABSTRACT

Bruzaferro EVM. Investigation of the brain-intestinal axis in CRAMP-deficient mice subjected to an experimental sepsis model [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2024.

The microbiota, the epithelium, and the intestinal mucosa are essential lines of defense against pathogens, toxins, and external antigens. Dysbiosis favors the prevalence and translocation of pathogens into the bloodstream through the barriers of the gastrointestinal tract, causing a dysregulation of the immune system. Such dysregulation can lead to sepsis due to an exacerbated systemic immune response, which spreads inflammation throughout the body and causes severe damage to different organs, including the brain, an immunologically privileged organ. Antimicrobial peptides are part of the innate immune system and are essential fighters against infections. Among them, the expression of cathelicidin LL-37/CRAMP during septic shock is reduced, while during mild infections, its expression is increased. This pro- and anti-inflammatory characteristic indicates its relevance in different clinical conditions, and understanding it is necessary to elucidate crucial stages of sepsis progression. The objective of this study was to analyze the inflammatory response in *Camp* gene *knockout* mice subjected to an experimental sepsis model. Damage to brain tissue and the impact on the intestinal microbiota of mice were evaluated. We observed an increase in the gene expression of S100A8 and S100A9 in the prefrontal cortex in wild-type animals compared to CRAMP-*knockout* animals, with a trend of increase in the hippocampus and cerebellum, which was not reflected in the final concentration of proteins. There was also a significant increase in the population of *Escherichia coli*, *Lactobacillus spp.*, and *Enterococcus faecalis* in *wild-type* animals 24 hours after CLP compared to the CRAMP-*knockout* group. Our data suggest that the absence of the CRAMP peptide resulted in a delay in the progression of sepsis.

Keywords: Cathelicidin. CRAMP. Sepsis. Microbiota. Antimicrobial peptides. Dysbiosis

## Lista de Figuras

Figura 1	Interação do eixo microbiota-intestino-cérebro.....	3
Figura 2	Estrutura básica do peptídeo LL-37/hCAP18 em humanos e CRAMP em camundongos.....	11
Figura 3	Análise da expressão gênica de S100A8 no córtex pré-frontal	27
Figura 4	Análise da expressão gênica de S100A8 no cerebelo.....	28
Figura 5	Análise da expressão gênica de S100A8 no hipocampo.....	29
Figura 6	Análise da expressão gênica de S100A9 no córtex pré-frontal	31
Figura 7	Análise da expressão gênica de S100A9 no hipocampo.....	32
Figura 8	Análise da expressão gênica de S100A9 no cerebelo.....	33
Figura 9	Análise quantitativa de S100A8 no córtex pré-frontal.....	35
Figura 10	Análise quantitativa de S100A8 no hipocampo.....	36
Figura 11	Análise quantitativa de S100A8 no cerebelo.....	37
Figura 12	Análise quantitativa de S100A9 no córtex pré-frontal.....	39
Figura 13	Análise quantitativa de S100A9 no hipocampo.....	40
Figura 14	Análise quantitativa de S100A9 no cerebelo.....	41
Figura 15	Análise quantitativa da população de <i>Escherichia coli</i> em material fecal.....	43
Figura 16	Análise quantitativa da população de <i>Lactobacillus</i> spp. em material fecal.....	44
Figura 17	Análise quantitativa da população de <i>Clostridium coccoides</i> em material fecal.....	45
Figura 18	Análise quantitativa da população de <i>Enterococcus faecium</i> em material fecal.....	46
Figura 19	Análise quantitativa da população de <i>Enterococcus faecalis</i> em material fecal.....	47

Figura 20	Análise quantitativa da população de Bactérias Filamentosas Segmentadas em material fecal.....	48
-----------	--	----

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Sequência dos <i>primers</i> de interesse.....	21
Tabela 2	Sequência dos <i>primers</i> bacterianos de interesse.....	23

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ANOVA	Analysis of Variance
AP-1	Activator protein 1
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina de Soro Bovino
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP	Ligadura Cecal e Punção
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRAMP	Cathelicidin-related antimicrobial peptide
CREB	cAMP-responsive element-binding
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DEPC	Dietilpirocarbonato
EAS	Encefalopatia associada à sepse
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GALT	Gut-associated lymphoid tissue
GPCR	G Protein Coupled Receptors
ICER	Inducible cAMP early repressor
IFN- $\gamma$	Interferon
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
KO	Knockout
LGIC	Ligand-gated Ion Channel
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1

MHC-I	Major Histocompatibility Complex I
NF- $\kappa$ B	Nuclear fator kappa B
NK	Natural Killer
PGRSS	Programa de Gerenciamento de Resíduos do Serviço de Saúde
PRR	Pattern Recognition Receptors
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotação Por Minuto
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
RT-qPCR	Reverse Transcription – Quantitative Polymerase Chain Reaction
S100A8	S100 Calcium binding protein A8
S100A9	S100 Calcium binding protein A9
SCFA	Short-chain fatty acids
SFB	Bactérias filamentosas segmentadas
SNC	Sistema Nervoso Central
TLR4	Receptor Toll-like 4
TLR9	Receptor Toll-like 9
TNF- $\alpha$	Tumour Necrosis Factor alpha
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WT	Wild-type

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	1
	1.1 Sepses.....	5
	1.2 Cérebro.....	6
	1.3 Peptídeos antimicrobianos.....	9
	1.4 Bacteriocinas.....	13
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	
	2.1 Objetivo geral.....	16
	2.2 Objetivos específicos.....	16
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	
	3.1 Local de Experimentos.....	17
	3.2 Comissão de Ética no uso de animais (CEUA).....	17
	3.3 Animais e Grupos Experimentais.....	17
	3.4 Modelo de ligadura e perfuração cecal (CELP).....	18
	3.5 Coleta de Tecidos.....	19
	3.6 Descarte de carcaças.....	19
	3.7 Extração de RNA.....	20
	3.8 <i>Primers</i> .....	20
	3.9 Gaiola metabólica e coleta de material fecal.....	21
	3.10 Processamento de material fecal e extração de DNA.....	22
	3.11 <i>Primers</i> bacterianos.....	22
	3.12 Extração de proteínas.....	24
	3.13 Quantificação de proteínas totais.....	24
	3.14 Ensaio de ELISA.....	25
	3.15 Análise estatística.....	25
<b>4</b>	<b>Resultados</b> .....	26
<b>5</b>	<b>Discussão</b> .....	49
<b>6</b>	<b>Conclusões</b> .....	54
<b>7</b>	<b>Anexos</b> .....	55
<b>8</b>	<b>Referências</b> .....	57



# *Introdução*



## 1 Introdução

A coevolução do ecossistema microbiano com os seres humanos foi determinante para o complexo equilíbrio que observamos hoje, resultado de uma co-dependência entre espécies. Desde o surgimento do primeiro ser pluricelular na natureza, nos vimos rodeados por micro-organismos unicelulares das mais diferentes formas e características, onde tivemos que aprender a conviver mutuamente para obtermos sucesso evolutivo. Apesar de estarmos inseridos diariamente nesta “piscina microbiana”, algumas regiões do nosso corpo possuem uma relação mais íntima com esses seres.

Podemos dizer que a pele, as vias aéreas, o trato urogenital, os olhos e o trato gastrointestinal são as zonas de maior relevância, tanto pela área de contato com o meio externo, como por possuírem uma microbiota colonizadora altamente específica. Apesar da grande importância de cada uma delas, a maioria dos micro-organismos que nos habitam está presente no intestino. Essa população, chamada de microbiota intestinal, participa diretamente na regulação metabólica do hospedeiro e, conseqüentemente, possui um papel essencial em seus processos fisiológicos e na sua saúde. Distúrbios nessa relação podem acarretar doenças cardiovasculares, metabólicas e inflamatórias, e que hoje, após diversos estudos, são diretamente associadas à composição das espécies presentes na microbiota intestinal (Cryan et al., 2019).

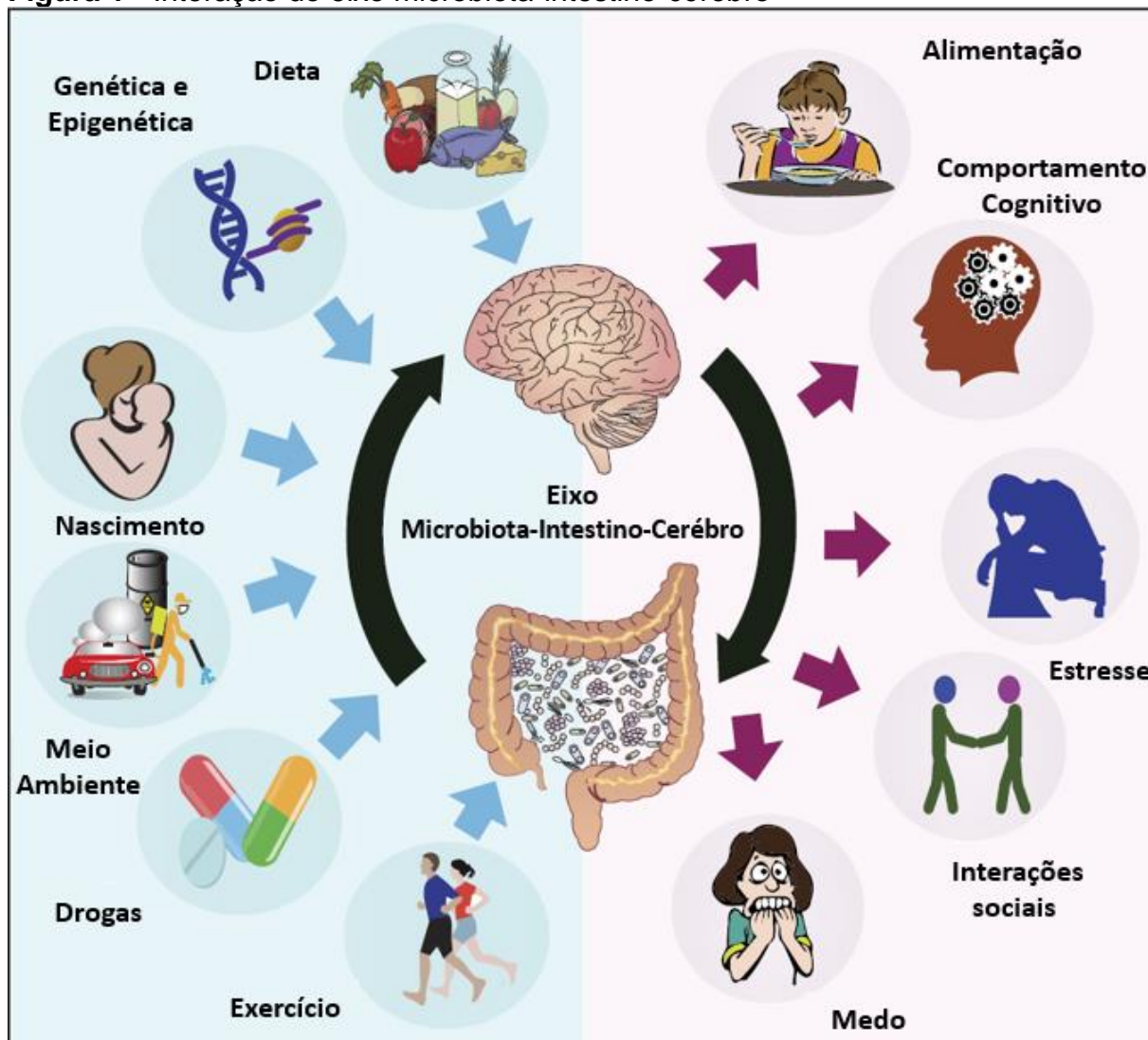
Segundo os dados disponibilizados pelo Human Microbiome Project, até o momento, estima-se que pelo menos 3000 espécies procariotas diferentes são capazes de habitar o corpo humano, onde a sua grande maioria está presente no trato gastrointestinal. Elas foram classificadas em 11 diferentes filos, entre eles Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes, que representam pelo menos 90% da microbiota (Hugon et al., 2015).

Devido a sua alta diversidade e complexidade, cada indivíduo apresenta uma microbiota intestinal relativamente específica, mesmo entre pessoas saudáveis. Apesar disso, diversos estudos recentes conseguiram correlacionar a incidência de certas espécies e suas proporções com diversos fatores genéticos e ambientais, de

estilo de vida, dieta, atividade física e região geográfica, determinando padrões de distribuição (Figura 1).

As bactérias comensais apresentam um ciclo de vida muito mais curto do que os seres humanos e são capazes de sofrer rápidas alterações evolutivas, adaptando-se rapidamente a alterações ambientais. Por vezes, entretanto, forças externas são capazes de moldar a microbiota de forma deletéria para o hospedeiro, gerando um estado conhecido como disbiose. Uma vez estabelecida, a disbiose pode exercer efeitos profundos no sistema imune, criando um ciclo vicioso no qual fatores celulares e metabólicos do hospedeiro e da microbiota influenciam um ao outro, perpetuando a disbiose. Essa condição implica em danos nas células epiteliais intestinais, ruptura das junções intracelulares e um retardado no reparo tecidual, fatores que foram diretamente relacionados a translocação bacteriana e dano sistêmico em um quadro de inflamação sistêmica aguda (Barbeiro et al., 2015). Essas alterações influenciam diretamente o eixo intestino-cérebro e, conseqüentemente, são responsáveis por algumas respostas fisiológicas patológicas como: inflamações exacerbadas do intestino, respostas inadequadas durante um quadro de estresse agudo ou crônico e estado alterado de comportamento (Cryan et al., 2019).

Os mecanismos que levam à disbiose no doente crítico permanecem pouco claros, mas são provavelmente relacionados ao amplo uso de antibióticos, injúria hipóxica, inflamação, hipomotilidade intestinal, quebra da barreira intestinal, tratamento com drogas vasopressoras, sedação, dentre diversos outros fatores intrínsecos e extrínsecos. Outro fator é que a microbiota intestinal do doente grave difere substancialmente da população saudável e é caracterizada por uma diminuição na diversidade filogenética e no número de micro-organismos comensais e crescimento aumentado de patobiontes.

**Figura 1** - Interação do eixo microbiota-intestino-cérebro

Fatores comuns, externos e internos, que podem afetar diretamente a microbiota intestinal, como a dieta, genética e epigenética, o modo de nascimento, sendo ele natural ou cesáreo, fatores ambientais, utilização de diversos tipos de drogas e o exercício físico, influenciam nosso comportamento alimentar, cognitivo, estresse, interações sociais e até na sensação de medo. Adaptado de Cryan et al., 2019.

Paralelo à microbiota, a barreira epitelial é uma estrutura anatômica altamente complexa, com junções intercelulares que são capazes de manter uma baixa permeabilidade devido à sua alta seletividade. Ela possui diferentes tipos celulares, entre elas enterócitos, células secretoras, células quimiosensitivas e o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (Aijaz et al., 2006). Os enterócitos expressam receptores associados ao sistema imune inato e são capazes de secretar citocinas e quimiocinas, enquanto o GALT abriga linfócitos responsáveis pela resposta imune adaptativa.

O trato gastrointestinal também comporta a maior concentração de células imunes no corpo. Elas estão em constante comunicação com a microbiota presente, via contato físico ou através de compostos secretados. Porém, esse contato é limitado por uma fina camada viscosa de muco, composta por glicoproteínas da família das mucinas, e que são secretadas por células caliciformes presentes na camada epitelial unicelular que reveste o lúmen intestinal. Desta forma, na interface lúmen-mucosa, ocorre a maior parte das interações e trocas moleculares entre a microbiota e o indivíduo.

Algumas moléculas atravessam a camada de muco e são capazes de interagir diretamente com a camada epitelial, facilitando a comunicação com o sistema imunológico. Polímeros presentes na parede celular de bactérias gram-positivas e -negativas, como por exemplo peptidoglicanos e polissacarídeos, auxiliam o sistema imunológico a identificar e diferenciar quais espécies estariam presentes no intestino, alertando prontamente alguma alteração na sua balança homeostática. Dessa forma, a interação e o reconhecimento de antígenos self e non-self pelo sistema imunológico, desempenha uma importante atividade estimuladora que é indispensável na preservação da barreira intestinal e de sua microbiota comensal, facilitando o reconhecimento de possíveis patógenos que possam surgir. Outro papel fundamental da mucosa intestinal é a proteção contra agentes indesejáveis presentes no lúmen, como toxinas e antígenos, por impedir o seu acesso direto à circulação sanguínea.

Os PRR (pattern recognition receptors), principalmente os receptores Toll-like (TLR), presentes nas células do epitélio são os responsáveis por fazer o reconhecimento de patógenos, e uma vez ativados, são capazes de produzir citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ , recrutar mediadores inflamatórios e, através de quimionas, atrair células responsáveis por uma resposta inflamatória mais proeminente (Takeda e Akira, 2004). Porém, foi demonstrado que um aumento na sinalização de TLR4 está diretamente associado à disruptura da barreira intestinal e ao aumento da translocação bacteriana, com uma expressão gênica alterada de peptídeos antimicrobianos (Dheer et al., 2016). Os peptídeos microbianos são responsáveis pela primeira linha de defesa do sistema imune inato, pois apresentam um papel fundamental na proteção da mucosa epitelial. Eles são secretados principalmente por células de Paneth e enterócitos presentes no epitélio, onde sua ação delimita a composição dessas comunidades no lúmen intestinal.

Em conjunto com o sistema imune inato, diversos metabólitos secretados por bactérias comensais também possuem ação moduladora. Neuromoduladores, bacteriocinas, ácidos biliares e ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) são também imunomoduladores. Um crescente número de dados produzidos por pesquisas recentes demonstra que as interações entre a microbiota e o indivíduo induz a liberação de citocinas, quimionas, neurotransmissores, neuropeptídeos e mensageiros endócrinos capazes adentrar a corrente sanguínea e influenciar na regulação cerebral, e inclusive, seu comportamento (Cryan et al., 2019).

Levando em consideração todos esses fatores, já está bem estabelecido que a microbiota intestinal é gravemente afetada durante uma doença grave. Porém, determinar qual é o evento que inicia este quadro ainda é uma questão sem resposta. Uma doença crítica poderia alterar a microbiota intestinal, porém a disbiose também poderia predispor doenças graves.

## 1.1 Sepses

A perda de função da barreira intestinal em conjunto com a propagação de substâncias danosas e/ou patobiontes provenientes do lúmen intestinal pode acarretar sepses (Senthil et al., 2006). Sepses é definida como uma disfunção dos órgãos potencialmente letal, causada por uma resposta imunológica desregulada frente a uma infecção (Napolitano, 2018). Já choque séptico é o termo dado quando o indivíduo apresenta hipotensão arterial relacionada à sepses, que não responde a ressuscitação volêmica, e acompanhada de acidose láctica ou outros sinais de hipoperfusão tecidual (Hotchkiss e Karl, 2003).

O choque séptico hoje afeta cerca de 10 a 30% dos pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva e é responsável por uma taxa de mortalidade em torno de 30 a 40%, sendo a primeira causa de óbito em Unidades de Terapia Intensiva não-coronarianas. Idosos, indivíduos com problemas crônicos de saúde ou um sistema imunológico comprometido, possuem um risco maior de desenvolver a doença (Mayr et al., 2014). Estima-se que 65% dos indivíduos que evoluem para um quadro de sepses grave possuem 65 anos ou mais, onde a taxa de mortalidade pode alcançar níveis por volta de 70% (Pinheiro da Silva e Machado, 2017).

Apesar do aumento e incentivo à procura de novos métodos diagnósticos e terapêuticos, a incidência de sepse é um fenômeno que apenas aumentou nas últimas décadas. A utilização de drogas antimicrobianas para tratar o foco infeccioso é a principal ferramenta para o manejo da evolução clínica da sepse, acompanhada muitas vezes de terapias de suporte, como a utilização de ventilação mecânica e métodos dialíticos, além da utilização de drogas vasoativas. Muitos destes métodos ainda contribuem para um aumento da taxa de infecção hospitalar como também o favorecimento do surgimento de novas cepas bacterianas extremamente resistentes aos antibióticos convencionais.

Além disso, determinar qual é o mecanismo que acarreta a morte dos pacientes é algo que ainda necessita esclarecimento. O resultado de necropsias realizadas em pacientes sépticos, logo após a morte, não demonstrou lesões suficientes que culminariam na morte desses pacientes ou até mesmo que não poderiam ter sido sanadas através de um tratamento auxiliar. Algo que é constantemente evidenciado é o fato de pacientes morrerem inesperadamente em virtude de um choque refratário ou colapso cardiovascular, ou quando a própria equipe médica decide interromper aos esforços de tratamento após evidenciarem insuficiência múltipla de órgãos, sem perspectiva de recuperação (Hotchkiss e Karl, 2003).

## 1.2 O Cérebro

Hoje sabemos que o trato gastrointestinal e o cérebro são capazes de influenciar um ao outro mutuamente de várias maneiras. Porém, até as últimas décadas, os estudos eram centrados majoritariamente na função digestiva e na saciedade após a alimentação. Recentemente esse leque foi expandido e estudos demonstraram que em animais livres de contaminação, germ-free, o desenvolvimento cerebral e cognitivo era profundamente afetado (Clarke et al., 2013; Diaz et al.; 2011; Sudo et al., 2004). Dentre os resultados obtidos, foi observado um aumento da mielinização neuronal no córtex pré-frontal, da neurogênese, da liberação de serotonina no hipocampo e da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Em contrapartida, uma diminuição da taxa de maturação da micróglia e da expressão de proteínas relacionadas à junção aderente (Cryan et al., 2019). Outros estudos também demonstraram que animais que recebiam espécies bacterianas diferentes

apresentaram mudanças de comportamento, o que foi demonstrado em seres humanos posteriormente (Pinto-Sanchez et al., 2017; Bercik et al., 2011; Bravo et al., 2011). E por fim, a administração de antibióticos durante os primeiros dias de vida e na fase adulta, demonstrou efeitos de longa duração no cérebro, na medula espinhal e no sistema nervoso entérico (O'Mahony et al., 2014; Verdu et al., 2008).

Devido ao fato de estar tecnicamente isolado do sistema imunológico pela barreira hematoencefálica e pela baixa expressão de moléculas de MHC-I em células do parênquima, o cérebro é considerado um órgão imuno privilegiado. Alterações exacerbadas no funcionamento do sistema imunológico no sistema nervoso central podem acarretar o risco de patologias extremamente incapacitantes ou até mesmo em morte. Por essa razão, o cérebro permanece protegido em um quadro de inflamação exacerbada ou resposta autoimune.

Entre a composição celular cerebral que observamos, podemos destacar as células endoteliais, gliais - astrócitos e micróglia - e os neurônios. A célula capaz de coordenar todo o ambiente imune cerebral e manter sua homeostasia é a micróglia. Ela é capaz de modular toda a rede neuronal e sua atividade, a plasticidade sináptica e é responsável pela fagocitose (Janda et al., 2018). Já os astrócitos, por exemplo, possuem a capacidade de transportar diversos substratos energéticos, combater patógenos, atuar na remoção de debris celulares por fagocitose e, promover reparo tecidual.

As células cerebrais são capazes de produzir óxido nítrico, citocinas e prostaglandinas que são capazes de modular a neurotransmissão cerebral, a produção e liberação de fator liberador de corticotropina, ACTH e vasopressina. Entretanto, neurotransmissores e neuro-hormônios, também modulam a expressão cerebral de mediadores inflamatórios que possuem a capacidade de influenciar o metabolismo celular, através da indução de estresse oxidativo e conseqüentemente disfunções mitocondriais. Essa influência pode acarretar diversas anormalidades, variando desde alterações das vias de neurotransmissão a apoptose.

Como discutido anteriormente, a microbiota possui alguns mecanismos capazes de influenciar o cérebro e isso engloba as células da micróglia. Elas são capazes de detectar as mudanças mais sutis no meio extracelular e montar respostas neuroinflamatórias, liberando citocinas e quimiocinas, regulando neurotransmissores



e alterando a sua plasticidade morfológica. Ademais, a inflamação parece exercer um estímulo prolongado da micróglia, o que acarreta diretamente na síntese e liberação de agentes pró-inflamatórios. Porém, uma microbiota diversa é necessária para a maturação da micróglia, necessária para manter seu papel funcional de maneira saudável. Como já citado, camundongos germ-free possuem um déficit na maturação microglial e conseqüentemente em sua função. Interessantemente, um estudo demonstrou que a recolonização do trato gastrointestinal com bactérias alvo ou a administração de metabólitos microbianos, como SCFA, foi capaz de restaurar sua função celular (Erny et al., 2015).

Em um quadro de sepse, algumas condições neurológicas anormais podem ser observadas nos pacientes. Uma delas, a encefalopatia associada à sepse (EAS), é uma das maiores evidências de disfunção orgânica durante a fase aguda e após a sua fase de recuperação. Ocorre raramente em jovens, mas com alta frequência na população em geral. Sua manifestação clínica apresenta variados sintomas, entre eles, diminuição da atividade mental, delírio e coma (Zampieri et al., 2011). Ela é definida por uma disfunção cerebral difusa devido a uma resposta desregulada do sistema imunológico do paciente, sem apresentar uma infecção atuando diretamente no sistema nervoso central (Chung et al., 2020). Estímulo inflamatório sistêmico, ativação da micróglia, redução da pressão arterial e danos endoteliais são conseqüências fisiológicas da EAS, que podem resultar em dano cerebral permanente. Cerca de 20% dos indivíduos que se recuperam do quadro de sepse apresentam sequelas neurológicas, como diminuição da capacidade física e/ou mental e alterações de humor, afetando diretamente a qualidade de vida (Götz et al., 2014).

Dentro do contexto neuro inflamatório, S100A9 é altamente expressa em células gliais, sendo utilizada como um marcador de lesão tecidual. S100A8 está diretamente envolvida em diversas patologias e danos relacionados ao sistema nervoso central (SNC). A neuro inflamação é principalmente mediada pela micróglia e astrócitos, que são capazes de secretar citocinas como TNF-  $\alpha$ , IL-6 e IL- $\beta$ , assim como recrutar linfócitos T (Wang et al, 2018).

S100A8 e S100A9 são proteínas caracterizadas como DAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Dano), que atuam como sinalizadoras para desencadear o processo inflamatório tecidual quando liberadas no meio extracelular (Ma et al., 2017). São principalmente derivadas de neutrófilos e macrófagos e diretamente relacionadas a processos inflamatórios, compreendendo até 45% das proteínas citoplasmáticas em neutrófilos (Wang et al, 2018)

Entender melhor as vias neurológicas e as regiões cerebrais que são afetadas nas diferentes fases da sepse é um fator essencial para prevenir danos permanentes. No contexto da EAS, hoje está claro que os principais processos envolvidos na sua patofisiologia é a neuroinflamação difusa, a excitotoxicidade e os processos isquêmicos e as regiões cerebrais mais afetadas durante o desenvolvimento da doença são o córtex pré-frontal, o hipocampo e o cerebelo (Gofton et Young, 2012).

### **1.3 Peptídeos Antimicrobianos**

A liberação de peptídeos antimicrobianos (AMPs) é a primeira linha de defesa proveniente da imunidade inata no combate a uma infecção. Uma ampla variedade de tipos celulares expressa AMPs de uma maneira constitutiva, porém, essa expressão também pode ser induzida de acordo com algum estímulo específico, como por exemplo através de moléculas de vitamina D ou interferon (IFN) (Vandamme et al., 2012). Foram identificados e preconizados mais de 1200 tipos de AMPs, de origens diferentes. Dentre eles, pelo menos 100 são provenientes de tecidos e superfícies epiteliais humanas (Wang, 2014; Lai et al., 2009). Possuem uma ampla diversidade estrutural, com composições diversificadas de aminoácidos. Costumam ser proteínas anfifílicas, com baixo peso molecular e de característica catiônica. Essas propriedades lhes concedem uma atividade antibiótica de amplo espectro, pois possuem a capacidade de inserção nas paredes celulares e membranas de micro-organismos, que são essencialmente formadas por fosfolipídios aniônicos. Dessa maneira, a interação resulta em lise celular e, conseqüentemente, na morte do micro-organismo (Pinheiro da Silva e Machado, 2012).

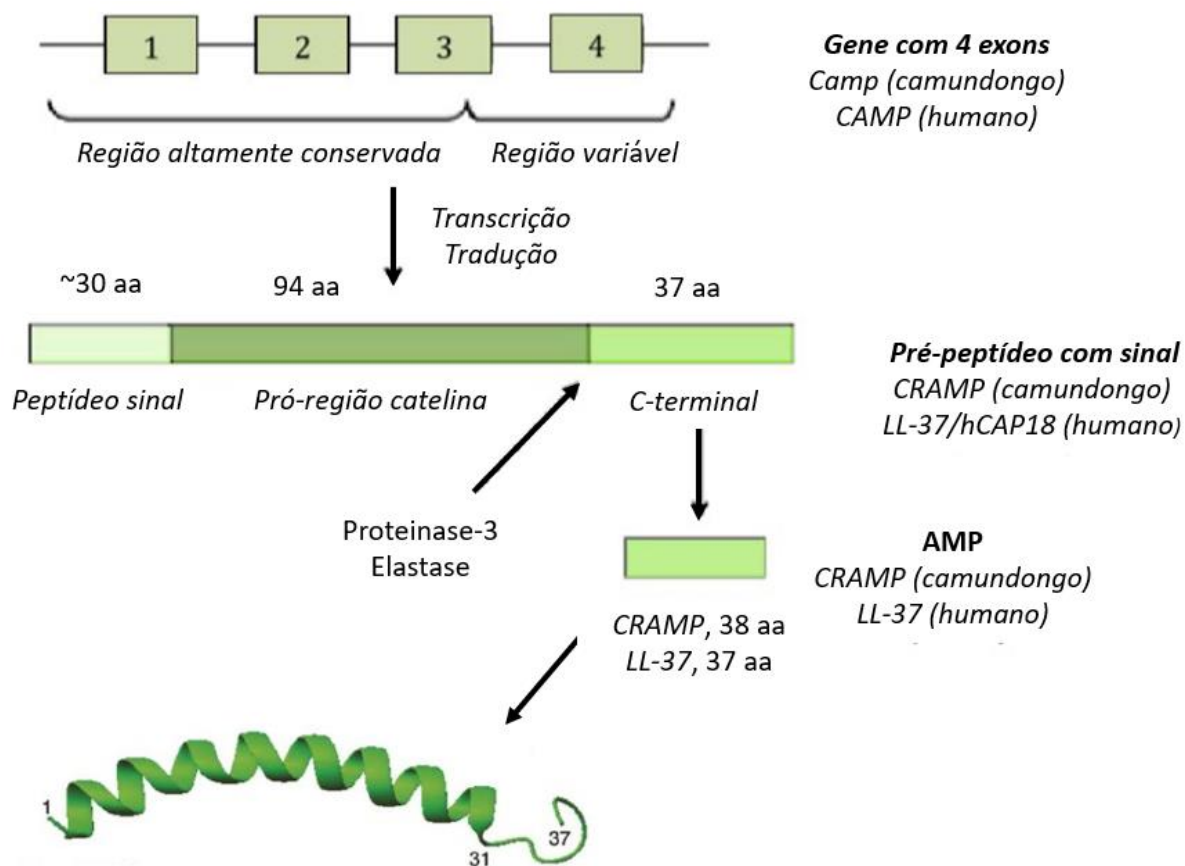
Por estarem presentes em diversos organismos diferentes, de bactérias a indivíduos do reino vegetal e animal, são considerados peptídeos primitivos com um alto grau de conservação gênica. Sendo assim, garantem uma proteção contra

parasitas, bactérias, fungos e vírus que estão presentes no meio ambiente e potencialmente prejudiciais à saúde. Devido ao seu papel proeminente na imunidade inata e seu baixo grau de toxicidade, AMPs são considerados moldes atrativos para a engenharia de novos fármacos e antibióticos (Verjans et al., 2016).

Em razão do contato recorrente de seres humanos com micro-organismos, as mucosas são colonizadas por uma microbiota altamente complexa. Outros tipos celulares, como queratinócitos, células epiteliais pulmonares e intestinais, células do trato reprodutivo e da superfície ocular, também produzem AMPs. Essa produção ocorre preferencialmente nessas regiões devido ao contato direto com o meio ambiente, e conseqüentemente, por lidar com patógenos exógenos com uma frequência mais elevada.

Apesar da ampla representação de  $\alpha$  e  $\beta$ -defensinas no grupo de AMPs em mamíferos, alguns AMPs lineares capazes de formar  $\alpha$ -hélices, que representam parte da família das catelicidinas também são expressos. As catelicidinas estão entre as classes mais estudadas de AMPs. Em humanos, foi descrita apenas uma representante, a LL-37, que é capaz de atuar de uma maneira similar e em conjunto com as defensinas (Frasca et Lande, 2012). Ela foi previamente identificada como hCAP18 e possuía uma porção C-terminal ao qual foi atribuída à capacidade de ligação ao LPS. Camundongos, assim como os humanos, apresentam apenas uma proteína da família das catelicidinas. Ela é considerada homóloga à hCAP18 devido ao seu alto grau de conservação evolutiva, sendo assim, denominada como CRAMP (Cathelin-Related Antimicrobial Protein). Na porção C-terminal, tanto da proteína humana, quanto da proteína do camundongo, existe uma região com 37 e 38 aminoácidos, respectivamente, que apresenta uma atividade bactericida de amplo espectro, tanto para bactérias gram-positivas, como gram-negativas. Com o avanço das pesquisas, foi observado que a hCAP18 era na realidade um pré-peptídeo (Figura 2), que após ser clivado, resultava em um peptídeo com 37 aminoácidos com diversas ações efectoras. Peptídeo este que foi posteriormente denominado LL-37, devido ao início de sua sequência de aminoácidos que apresenta duas leucinas (Vandamme et al, 2012).

**Figura 2** - Estrutura básica do peptídeo LL-37/hCAP18 em humanos e CRAMP em camundongos



O gene *Camp* ou *CAMP* em camundongos e humanos, respectivamente, é transcrito e traduzido em um pré-peptídeo que é capaz de ser clivado pelas enzimas Proteinase-3 e Elastase. O peptídeo resultante de sua região C-terminal, denominado LL-37 ou CRAMP, possui forte ação bactericida. Adaptado de Febriza et al., 2019.

Ele age como um potente quimioatraente, servindo como ponte entre o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo, guiando monócitos, neutrófilos e células T para o sítio de infecção. Entendendo melhor esse processo, foi demonstrado que ela possui um forte papel imuno-estimulador e imunomodulador, regulando os níveis de citocinas inflamatórias e controlando a fina balança entre a resposta anti e pró-inflamatória (Verjans et al., 2016).

Eles também são expressos em células do sistema imune, tais como monócitos, neutrófilos, mastócitos e células NK. Essa expressão se dá de maneira constitutiva e sua proteína precursora é armazenada em grânulos. Durante uma infecção ou dano

tecidual, a ativação de TLR por endotoxinas e/ou alguma alteração no microambiente de citocinas, desencadeiam a degranulação. Dessa maneira, a proteína precursora hCAP18/CRAMP é liberada no ambiente extracelular e clivada no peptídeo ativo, por proteinases específicas (Sørensen et al., 2001).

Neutrófilos, por exemplo, são responsáveis pela alta concentração desses peptídeos no sítio de inflamação, para dar início a uma resposta imune robusta e a rápida eliminação de agentes infecciosos. Outras células do sistema imune, como células dendríticas, macrófagos e linfócitos T, também são capazes de expressar e interagir com a LL-37 (Durr et al., 2006). Devido ao grau de relevância que é a capacidade de iniciar o processo da resposta imune inata, a LL-37 se tornou o alvo de novas pesquisas em diversas áreas de interesse, como doenças infecciosas, autoimunes e câncer. Sua expressão pode ocorrer por contato direto com uma bactéria ou por constituintes da parede celular bacteriana, como LPS. Distúrbios ocorridos na barreira epitelial celular, estresse no retículo endoplasmático, infecções e feridas também pode desencadear sua expressão.

Entretanto, a LL-37/CRAMP apresenta uma dubiedade em seu mecanismo de ação, hora pró-inflamatório, hora anti-inflamatório, dependendo da patologia e do contexto celular, que ainda necessita maiores investigações. Resultados obtidos pelo nosso grupo demonstraram que, em um quadro de choque séptico em humanos, a expressão de LL-37 em neutrófilos é reduzida se comparado com pacientes em recuperação ou com um quadro de sepse (Barbeiro et al., 2013). Outros estudos também demonstraram que comparado a pacientes saudáveis, a expressão de LL-37 também é reduzida no plasma (Jeng et al., 2009). A ausência de CRAMP em neutrófilos de camundongos reduziu a aterosclerose (Doring et al., 2012), por exemplo, mas aumentou a susceptibilidade à infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (Huang et al., 2007), evidenciando seu amplo papel de ação.

Grande parte dos efeitos induzidos pela catelicidina é mediada pela ativação direta de receptores que estão presentes na membrana celular e intracelulares. Ela foi associada a nove receptores que estão relacionados a diversas classes, entre elas: GPCRs, RTKs, LGIC e TLRs (Verjans et al., 2016). Sua via de sinalização é regulada por cAMP. A proteína CREB (cAMP-responsive elemento-binding) e a proteína AP-1 (Activator protein 1) competem diretamente com o ICER (Inducible cAMP early repressor), um repressor da indução da catelicidina, para se ligarem a sequência

promotora do gene da catelicidina, regulando sua expressão (Chakraborty et al, 2009). Alguns sinais oriundos da citocina IL-6, por estresse psicológico (glicocorticóides), exotoxinas bacterianas, transmigração através do epitélio ativado e algumas bactérias específicas, podem diminuir a expressão da catelicidina.

Camundongos knockout para o gene CRAMP demonstraram um aumento da susceptibilidade a infecções virais e bacterianas, resultando em um aumento de morbidade e mortalidade (Chromek et al., 2006; Imura et al., 2005). Um estudo realizado por Brandenburg et al. (2010), demonstrou que em ratos, o peptídeo CRAMP é capaz de interagir com as vias imunológicas cerebrais através do receptor purinérgico P2Y11 e possui um papel importante na proteção das células cerebrais através do estímulo à liberação de citocinas e da ativação de células da glia.

Resultados ainda não publicados e obtidos pelo nosso grupo de pesquisa pela pesquisadora Marta Lucia de Almeida, demonstraram que camundongos CRAMP knockout submetidos ao modelo experimental de sepse, ligadura cecal e punção (CLP), não demonstraram uma grande alteração da microbiota intestinal comparados a animais controle. A única evidência foi o aumento da população intestinal de *Escherichia coli* e conseqüentemente a sua translocação para a corrente sanguínea. A classe de bactérias filamentosas segmentadas (SFB), gêneros como *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* e espécies, como *Streptococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, não apresentaram diferenças significativas.

#### 1.4 Bacteriocinas

Como discutido anteriormente, as bactérias não são apenas agentes passivos no trato gastrointestinal. Elas são capazes de produzir metabólitos que as favorecem em um cenário de competição com outras espécies e que atuam diretamente no sistema imunológico, modulando-o. Entre esses produtos, estão as bacteriocinas, que são classificadas em 3 grandes grupos baseados em: estrutura primária; peso molecular; modo de ação; estabilidade e; propriedades genéticas. A classe I é composta por pequenos peptídeos resistentes ao calor e menores do que 10 kDa. São amplamente modificados após a tradução. Por exemplo, a nisina, que é um importante membro do grupo mais estudado da classe I, os lantibióticos, é capaz de permeabilizar a membrana bacteriana após a ligação em lipídeos II, através da

formação de poros. Membros da classe II são caracterizados por serem pequenos peptídeos resistentes ao calor, menores do que 10 kDa e por não serem modificados após a tradução. Membros da classe III são grandes moléculas, maiores do que 30 kDa, sensíveis ao calor e composto por diferentes domínios (Vasilchenko e Valyshev, 2019).

Elas expõem seus grupos positivamente carregados para interagirem eletrostaticamente com a porção aniônica da membrana externa bacteriana. Entretanto, algumas bacteriocinas necessitam de um sítio de ligação para se ligarem à superfície da membrana externa. A superfície hidrofóbica da membrana bacteriana facilita o acoplamento de fosfolipídios e a formação de complexos, a auto associação com peptídeos e a polimerização. (Shahnawaz e Soto, 2012). Estes processos permeabilizam a membrana celular através da formação de poros seletivos para íons que causam a disruptura da força protomotiva (Christensen e Hutkins, 1992). Dessa forma, ela pode produzir a fuga de substratos intracelulares, inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, e, eventualmente, morte celular. Devido ao seu papel relevante, as bacteriocinas têm sido amplamente estudadas como uma alternativa futura aos antibióticos convencionais (Garcia-Gutierrez et al., 2019).

Dicks et. al questionou se bacteriocinas são capazes de atravessar a barreira hemato-intestinal e quais são seus possíveis efeitos em células de mamíferos, devido ao fato de serem peptídeos catiônicos ativos de membrana e possuírem a capacidade de se ligarem às células sanguíneas e proteínas do plasma (Dicks et al., 2018). Dessa forma, como a translocação bacteriana é um fenômeno bem estabelecido, não existe razão para acreditar que bacteriocinas não cruzam a barreira epitelial intestinal. Uma vez que, na corrente sanguínea, elas também poderiam atravessar a barreira hematoencefálica e participar no processo neuro inflamatório, iniciado em várias patologias sistêmicas.

Ao todo, Severino et al. (2017) demonstrou que camundongos CRAMP knockout submetidos ao modelo de CLP possuem uma sobrevida maior do que animais controle, demonstrando um possível papel deletério da catelicidina em um quadro de sepse. Por outro lado, foi verificado que houve uma resposta mais robusta do sistema imune inato nesses animais, com um aumento do nível plasmático de IL-1 $\beta$ , IL-6 e MCP-1. Essa resposta compensatória foi ocasionada pela deficiência de catelicidina, o que indica uma mudança para outras vias inflamatórias. Porém, em seres humanos,

os níveis plasmáticos de LL-37 estão reduzidos em pacientes com quadros de sepse e choque séptico.

Este trabalho possui o intuito de aprofundar a compreensão do papel das catelicidinas em camundongos através da sua investigação em animais CRAMP-*knockout* e controle, submetidos ao modelo de sepse (CLP). Resta avaliar se a ausência de CRAMP em camundongos *knockout* é capaz de influenciar diretamente a microbiota intestinal desses animais e/ou facilitar a translocação de bactérias, como *Escherichia coli*, para a corrente sanguínea. E, por fim, avaliar os possíveis danos no sistema nervoso central resultantes da translocação bacteriana ou de seus metabolitos, como as bacteriocinas, através de marcadores de dano tecidual.



# *Objetivos*



## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imuno-inflamatória em tecido cerebral de camundongos selvagens da linhagem C57Bl/6 e CRAMP knockout, submetidos ao modelo experimental de sepse, ligadura e punção cecal (CLP) e quais as principais consequências na composição da microbiota intestinal destes camundongos.

### 2.2 Objetivos Específicos

Quantificar em diferentes tecidos, o RNA mensageiro transcrito de marcadores de dano cerebral e citocinas, e comparar entre os grupos que foram submetidos a CLP ou não, através da técnica de RT-qPCR.

Avaliar possíveis marcadores de interesse e realizar a sua quantificação através da técnica de ELISA, comparando seus níveis traducionais entre animais wild-type e CRAMP-*knockout* com o intuito de auxiliar na compreensão do papel do peptídeo CRAMP no sistema imunológico.

Quantificar e avaliar diferentes espécies bacterianas de interesse presente na microbiota intestinal de camundongos através de qPCR em Tempo-Real, antes e depois da indução ao modelo experimental de sepse e seu papel no quadro inflamatório.

# *Materiais e Métodos*



### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Local de Experimentação

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM-51) da Disciplina de Emergências Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os camundongos foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina de São Paulo e mantidos em gaiolas convencionais no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia, do Departamento de Clínica Médica, a partir de 7 semanas de idade.

#### 3.2 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP sob o protocolo de pesquisa 1288/2019, em 18 de abril de 2019, a utilização de 30 camundongos C57Bl/6 e 30 camundongos CRAMP/KO conforme o documento do Anexo A. Foi solicitada uma inclusão de 20 animais C57Bl/6 e 20 animais CRAMP/KO aprovada sob o mesmo protocolo de pesquisa, 1288/2019, em 17 de setembro de 2020 conforme o documento do Anexo B.

#### 3.3 Animais e Grupos Experimentais

Para a realização do estudo foram utilizados camundongos do sexo masculino, entre 8 e 10 semanas, com peso médio de 20g e divididos em quatro grupos distintos: animais C57Bl/6 *wild-type* (WT) utilizados como controle; animais C57Bl/6 submetidos ao modelo experimental de sepse por ligadura e punção cecal (CLP); animais CRAMP-*knockout* utilizados como controle; e por fim, animais CRAMP-*knockout* submetidos ao modelo CLP. Inicialmente, foram necessários 8 animais por grupo, totalizando um número de 32 animais, para a realização de ensaios de quantificação de RNA mensageiro.

Em uma segunda etapa do estudo, para a quantificação de proteínas e análise de microbiota, foram utilizados 11 animais C57Bl/6 *wild-type*; 11 animais C57Bl/6 submetidos a CLP; 11 animais CRAMP-*knockout*; e 11 animais CRAMP-*knockout* submetidos a CLP, totalizando um número de 44 animais. Todos os procedimentos apenas foram iniciados após devida submissão e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em 18 de abril de 2019 para a primeira etapa e após a submissão de aprovação em 17 de setembro de 2020, para a segunda etapa.

### 3.4 Modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP)

Para os grupos de animais submetidos à sepse, foi realizado o modelo de CLP, que se deu pelas seguintes etapas:

- ✓ Os animais foram inicialmente anestesiados via intraperitoneal com uma solução de Ketamina (80mg/kg) – Cristalia, São Paulo - Brasil e Xilazina (10 mg/kg) – Cristalia, São Paulo - Brasil.
- ✓ Foram então submetidos a laparotomia com incisão de aproximadamente 2 cm em linha mediana na região esquerdo do abdômen do animal, o suficiente para se exteriorizar o ceco.
- ✓ Foi utilizado um fio de algodão 3.0 para realizar firme ligadura cecal abaixo da inserção do íleo distal ao ceco, compreendendo cerca de um terço do ceco, de forma que não causasse obstrução intestinal.
- ✓ Foram então realizadas duas punções com uma agulha 22G ao ceco, de maneira distal à ligadura e o local da punção foi posteriormente comprimido para se testar a eficiência das punções, de maneira que o material fecal presente no ceco fosse exteriorizado no peritônio.
- ✓ Ao final da cirurgia, o ceco e todas as vísceras exteriorizadas foram devolvidos para cavidade abdominal. Os camundongos foram suturados com fios de Nylon em duas etapas, primeiramente o peritônio e depois a pele. Os animais foram então identificados um a um com linhas de caneta em suas caudas e os horários de início e fim de cirurgia, como também o período, foram todos registrados. Cada cirurgia levou um tempo médio de 25 minutos. Cada animal foi colocado em repouso separadamente até estarem completamente

despertos, sendo reintroduzidos em suas gaiolas com até no máximo três indivíduos.

Os camundongos foram mantidos, após o procedimento, no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia recebendo água e ração “*ad libidum*” (Nuvilab CR1 – Nivutal Nutrientes, São Paulo - Brasil) em ambiente controlado, com períodos alternados de claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente oscilando entre 21 e 23 graus *Celsius*.

### **3.5 Coleta de Tecidos**

Poucas horas após a cirurgia de indução da sepse experimental por CLP, os animais demonstravam sinais clínicos de infecção sistêmica, tais como pelos eriçados, prostração e vasoconstrição. Foi respeitado o tempo de 24 horas e a ordem do procedimento cirúrgico para evitar possíveis oscilações na concentração de neuropeptídeos e citocinas devido ao ciclo circadiano, e outros fatores externos, entre animais do mesmo grupo analisado.

Os animais foram eutanasiados após anestesia intraperitoneal em dose letal com Xilazina e Ketamina, respeitando o período pós cirúrgico de 24 horas. Após uma ampla incisão na parede abdominal, o sangue do animal foi coletado para obtenção do plasma através da veia cava inferior. O íleo terminal e o cólon ascendente foram coletados e seu material fecal interno foi descartado com o auxílio de soro fisiológico (Cloreto de Sódio 0.9%). A caixa torácica foi então exposta e o tecido pulmonar foi removido e armazenado para futuros ensaios. Por fim, foi realizada uma craniotomia com remoção do encéfalo e posterior separação do córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo. Todas as amostras foram inseridas dentro de tubos criogênicos e prontamente congeladas em nitrogênio líquido e seu armazenamento foi realizado em freezer -80°C até o momento das análises experimentais.

### **3.6 Descarte de carcaças**

Conforme as legislações vigentes de resolução RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA 358 de 29 de abril de 2005, o descarte das

carcaças dos animais foi embasado no Programa de Gerenciamento de Resíduos do Serviço de Saúde (PGRSS) da FMUSP para resíduos infectantes do tipo A2.

### 3.7 Extração de RNA

Os tecidos foram triturados em ambiente estéril com o auxílio de um macerador, ainda congelados, com o suporte de nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizados em 1mL de *TRIzol*<sup>®</sup> (*Ambion – Life technologies*) em tubos *Eppendorf*<sup>®</sup>. Foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Posteriormente foram adicionados 0,2mL de clorofórmio (*Sigma – Aldrich*) a cada amostra, incubadas novamente em temperatura ambiente durante 3 minutos e centrifugadas a 12.000 RPM por 15 minutos à 4°C. O RNA precipitado de cada amostra foi transferido para outro tubo e foram adicionados 0,5mL de isopropanol (*Sigma – Aldrich*) gelado e 20µL de acetato de sódio 2M.

As amostras foram incubadas novamente por 20 minutos à -20°C e posteriormente centrifugadas à 12.000 RPM por 10 minutos à 4°C. Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi removido, o RNA presente no fundo do tubo foi lavado com 1mL de etanol 75% gelado e novamente as amostras foram centrifugadas à 10.000 RPM por 5 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de RNA foi deixado para secar na bancada por 10 minutos. O RNA foi re-suspendido e diluído em 30µL de água DEPC (*Invitrogen*) pré-aquecida à 65°C e incubado por 10 minutos à 65°C em banho seco. Cada amostra foi tratada com DNase (*Invitrogen*) e 1µL de EDTA (*Invitrogen*) 25nM. Cada amostra foi quantificada em um espectrofotômetro *NanoVue Plus – GE Healthcare Life Sciences*.

### 3.8 Primers

Os oligonucleotídeos foram adquiridos através da *Thermo Fisher Scientific*. As sequências dos *primers* utilizados estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Sequência dos *primers* de interesse

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUÊNCIA (5' – 3')</b>
S100A8 sense	AAATCACCATGCCCTCTACAAG
S100A8 antisense	CCCACCTTTTATCACCATCGCAA
S100A9 sense	ATACTCTAGGAAGGAAGGACACC
S100A9 antisense	TCCATGATGTCATTTATGAGGGC

Após a quantificação do RNA extraído de cada tecido, cada amostra foi diluída para a concentração final de 20ng/μL, em água DEPC (*Invitrogen*), perfazendo 100μL e mantidas em freezer à -20°.

Inicialmente cada *primer* foi testado nos três tecidos cerebrais, com o intuito de verificar a qualidade dos *amplicons* e a necessidade de ajustes em suas temperaturas. Cada produto advindo dos testes iniciais foi verificado posteriormente através de eletroforese em gel de agarose para validação. As amostras foram amplificadas via RT-qPCR pelo termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System – Applied BioSystems* utilizando o kit *SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR (Invitrogen)*.

### 3.9 Gaiola metabólica e coleta de material fecal

Após a amplificação dos *primers* e seleção das proteínas de interesse, utilizamos novos grupos de animais onde: 11 animais C57Bl/6 *wild-type*; 11 animais C57Bl/6 submetidos a CLP; 11 animais *CRAMP-knockout*; e 11 animais *CRAMP-knockout* submetidos a CLP, foram experimentados tanto para extração de proteínas, como análise da microbiota advinda do material fecal.

Os dois grupos de animais que foram submetidos a CLP, foram utilizados como controles próprios, sendo pré- e pós-cirúrgico. Os animais saudáveis foram inseridos individualmente em gaiolas metabólicas (*Tecniplast – Itália*) previamente esterilizadas antes da cirurgia para ambientação, com água e ração *ad libidum*. Todo material fecal produzido em um período de 24 horas foi coletado e armazenado em tubos criogênicos. Os mesmos animais foram submetidos a CLP conforme descrito anteriormente no tópico 3.4. Após a cirurgia, os animais foram introduzidos em novas



gaiolas metabólicas (*Tecniplast – Itália*) esterilizadas por mais um período de 24 horas e todo material fecal produzido durante o pós-cirúrgico também foi coletado e armazenado em tubos criogênicos. Todo material produzido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de extração de DNA e quantificação via qPCR.

Os animais que foram alocados em gaiolas metabólicas (*Tecniplast – Itália*), foram eutanasiados 24 horas após a CLP, assim como seus controles mantidos em gaiolas convencionais, conforme descrito no tópico 3.5.

### 3.10 Processamento de material fecal e extração de DNA

Todo material fecal obtido através da gaiola metabólica e armazenado à  $-80^{\circ}\text{C}$  foi processado utilizando o kit *QIAmp® PowerFecal® Pro DNA Kit – Qiagen - Alemanha*. As amostras foram retiradas do  $-80^{\circ}\text{C}$  e descongeladas em gelo até o momento adequado para iniciar o protocolo fornecido pela *Qiagen*. O kit recomenda a utilização de até 250mg de amostras fecais, o que não foi possível ser obtido em animais que foram submetidos a CLP. Foi obtida uma média de 150mg para estes camundongos, o que não foi um impeditivo para a realização do experimento, pois a quantidade de DNA bacteriano amplificado posteriormente pôde ser normalizada.

Cada amostra resultou em 80µL de solução contendo DNA bacteriano e foi posteriormente validada e quantificada em um espectrofotômetro *NanoVue Plus – GE Healthcare Life Sciences*.

### 3.11 Primers bacterianos

Os oligonucleotídeos necessários para amplificação de DNA foram adquiridos através da *Thermo Fisher Scientific*. As sequências dos *primers* bacterianos utilizados estão listadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Sequência dos *primers* bacterianos de interesse

<b>PRIMER</b>	<b>SEQUÊNCIA (5' – 3')</b>
<i>s-Escherichia coli</i> sense	GAGTAAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG
<i>s-Escherichia coli</i> reverse	GAGACTCAAGCTKRCCAGTATCAG
<i>Lactobacillus spp</i> sense	AGCAGTAGGGAATCTTCCA
<i>Lactobacillus spp</i> reverse	CACCGCTACACATGGAG
<i>Clostridium coccooides</i> sense	AAATGACGGTACCTGACTAA
<i>Clostridium coccooides</i> reverse	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA
<i>Enterococcus faecium</i> sense	CCATGTGTAGCGGTGAAATG
<i>Enterococcus faecium</i> reverse	CGGAAACCCTCCAACACTTA
<i>Enterococcus faecalis</i> sense	CCATGTGTAGCGGTGAAATG
<i>Enterococcus faecalis</i> reverse	CGGAAACCCTCCAACACTTA
Bactéria Filamentosa Segmentada sense	AGGAGGAGTCTGCGGCACATTAGC
Bactéria Filamentosa Segmentada reverse	TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAG

Após a quantificação do DNA extraído de cada amostra fecal, foi realizada uma diluição para a concentração final de 20ng/μL, em água DEPC (*Invitrogen*), perfazendo 100μL e mantidas em freezer à temperatura de -20°C.

Inicialmente cada *primer* foi testado para cada espécie ou grupo bacteriano, com o intuito de verificar a qualidade dos *amplicons* e a necessidade de ajustes em suas temperaturas. As amostras foram amplificadas via qPCR pelo termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System – Applied BioSystems* utilizando o kit *Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen)*.

### 3.12 Extração de proteínas

Os tecidos previamente congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram triturados em uma superfície estéril com um macerador, também previamente esterilizado, com auxílio de nitrogênio líquido para manter a temperatura negativa durante todo o processo. O material macerado foi cuidadosamente coletado e armazenado em tubos criogênicos. Os tecidos foram então re-suspendidos e homogeneizados em  $500\mu\text{L}$  de PBS  $0,01\text{M}$ , pH 7.4 e foram congelados a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até a próxima etapa do processo.

As amostras então foram todas recuperadas e submetidas a três ciclos de aquecimento e resfriamento para ruptura da membrana celular. Foi utilizado banho-maria previamente aquecido a  $70^{\circ}\text{C}$  e nitrogênio líquido para resfriamento das amostras. As amostras foram intercaladas por 10 segundos em cada condição de aquecimento e resfriamento e ao final de três ciclos elas foram colocadas em banho-maria por mais 10 segundos para encerrar o processo. Todas as amostras foram então posteriormente centrifugadas a  $1.500\text{g}$  e temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. O sobrenadante foi então recuperado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização do ensaio de ELISA e os debris celulares e tecidos sobressalentes foram descartados.

### 3.13 Quantificação de proteínas totais

Foi realizada a diluição seriada da albumina de soro bovino (BSA) para determinar a curva padrão para base comparativa à nossas amostras, com a utilização de água destilada como referência zero. As amostras foram então descongeladas em gelo e  $5\mu\text{L}$  de cada amostra foi diluída em  $45\mu\text{L}$  de água destilada.

Foi diluída a quantia de  $2,8\text{mL}$  de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*) em  $11,2\text{mL}$  de água destilada e para cada  $10\mu\text{L}$  das amostras previamente diluídas, foi utilizada a quantia de  $200\mu\text{L}$  da solução de Bradford.

Ao final da preparação do experimento, a leitura foi realizada a  $450\text{nm}$  pelo leitor de ELISA *VersaMax™* – USA e os resultados obtidos e calculados através do software *xPONENT 3.1*.

### 3.14 Ensaio de ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado para as proteínas S100A8 e S100A9 conforme protocolos oferecidos pela *MyBioSource - USA* através dos kits *Mouse S100A8 (S100 Calcium Binding Protein A8) ELISA Kit* e *Mouse S100A9 ELISA Kit*. A leitura foi realizada a 450nm pelo leitor de ELISA *VersaMax™ - USA* e os resultados obtidos e calculados através do software *xPONENT 3.1*.

### 3.15 Análise estatística

O teste estatístico realizado para verificação de normalidade dos grupos foi o teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente foi considerado o teste de ANOVA para dados paramétricos e Kruskal-Wallis para dados não paramétricos em avaliação entre grupos. Em análise *post-hoc*, foi realizado o teste t-student para amostras não pareadas com correção de Welch, devido a variância diferente entre os grupos ou o teste U de Mann-Whitney. O valor considerado como estatisticamente significativo foi o de  $p < 0,05$ .

O software utilizado para a construção da análise estatística e obtenção dos resultados foi o Graph Pad Prism 9.0.0.

# *Resultados*



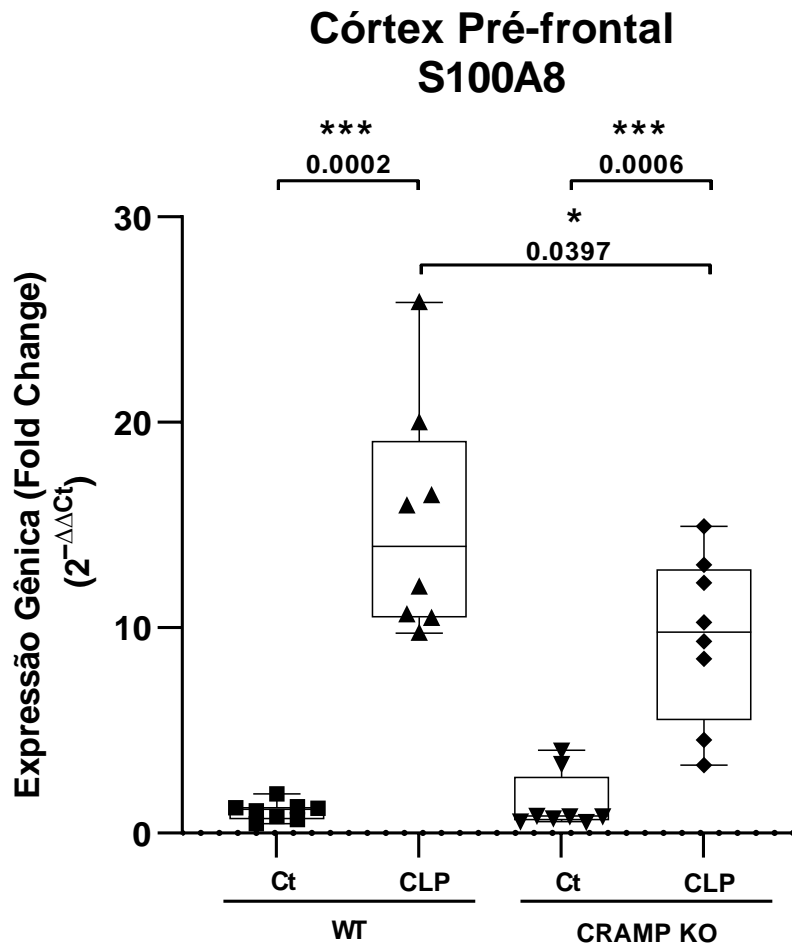
## 4 Resultados

Para a realização da primeira etapa dos ensaios, foram utilizados 32 animais divididos em 4 grupos diferentes. O procedimento de CLP foi realizado em 8 animais do grupo *wild-type* e em 8 animais do grupo *CRAMP-knockout*. Os outros dois grupos, ou seja, 16 animais, foram mantidos em gaiolas, sem intervenção cirúrgica, com as mesmas condições de temperatura, umidade e alimentação *ad libidum*.

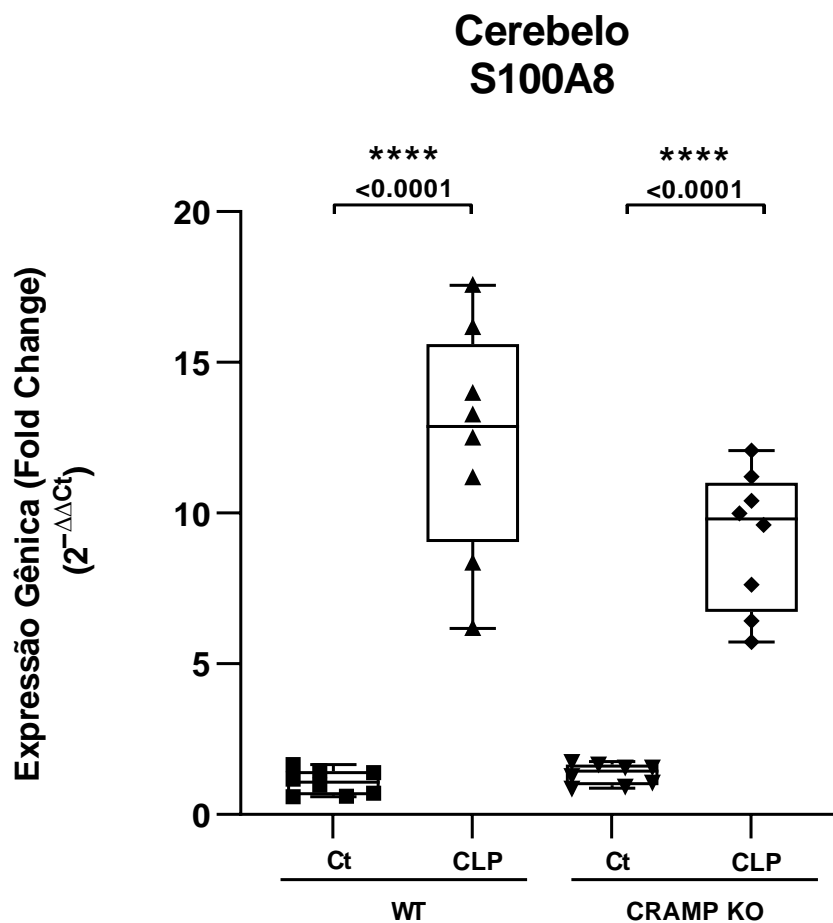
O racional desta primeira etapa foi avaliar, em animais com sepse experimental induzida, se houve um aumento expressivo no processo de transcrição e nas quantidades de RNA mensageiro para marcadores de dano cerebral e inflamação, como S100A8 e S100A9, em diferentes regiões cerebrais. Nessa primeira etapa foram coletadas o córtex pré-frontal, o hipocampo, o cerebelo, pulmões, o plasma, cólon ascendente e íleo terminal de todos os animais.

Ao quantificar a concentração de RNA mensageiro para a proteína S100A8 através de RT-qPCR no córtex pré-frontal, observamos uma diferença estatisticamente relevante entre os animais que foram submetidos a CLP em comparação com seus animais controle, que não foram submetidos a cirurgia. O mesmo ocorre entre os grupos submetidos a cirurgia, onde a quantidade de RNA transcrito foi estatisticamente superior em animais expressando o peptídeo CRAMP (Figura 3).

Uma resposta semelhante pode ser observada no hipocampo e no cerebelo desses animais, onde houve um aumento expressivo na transcrição entre os grupos controles e submetidos a CLP. Entretanto, não foi possível constatar a mesma diferença estatística entre os grupos com sepse (Figura 3 e 4).

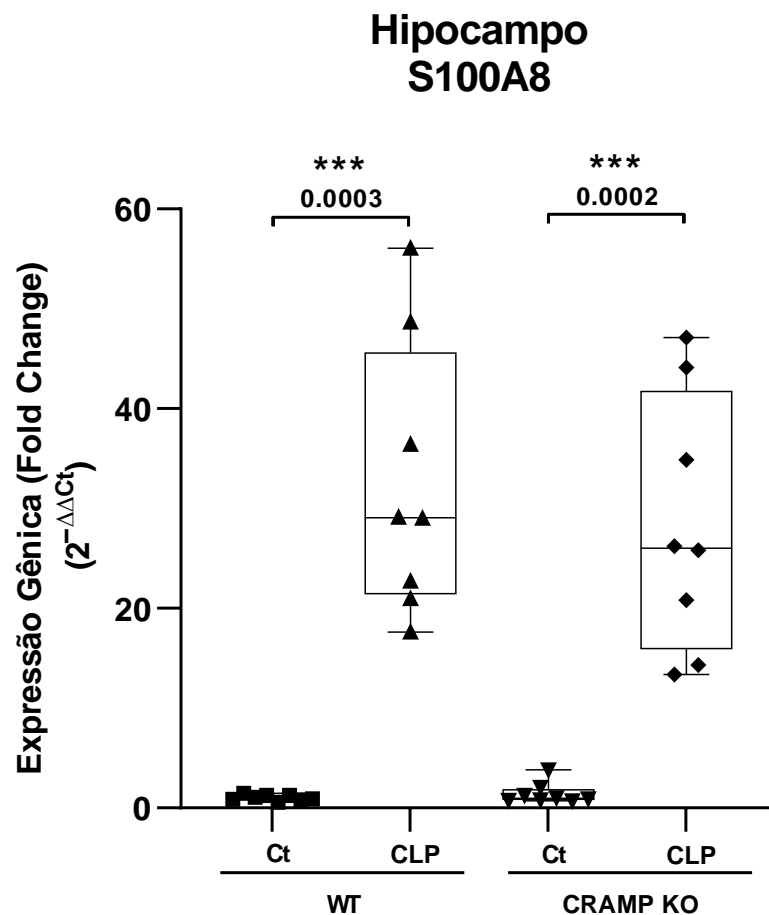
**Figura 3** - Análise da expressão gênica de S100A8 no córtex pré-frontal

Foi analisada a expressão gênica de S100A8 no córtex pré-frontal de camundongos C57Bl/6 wild-type (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 wild-type (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados via RT-qPCR. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

**Figura 4** - Análise da expressão gênica de S100A8 no cerebelo

Foi analisada a expressão gênica de S100A8 no cerebelo de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados via RT-qPCR. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .



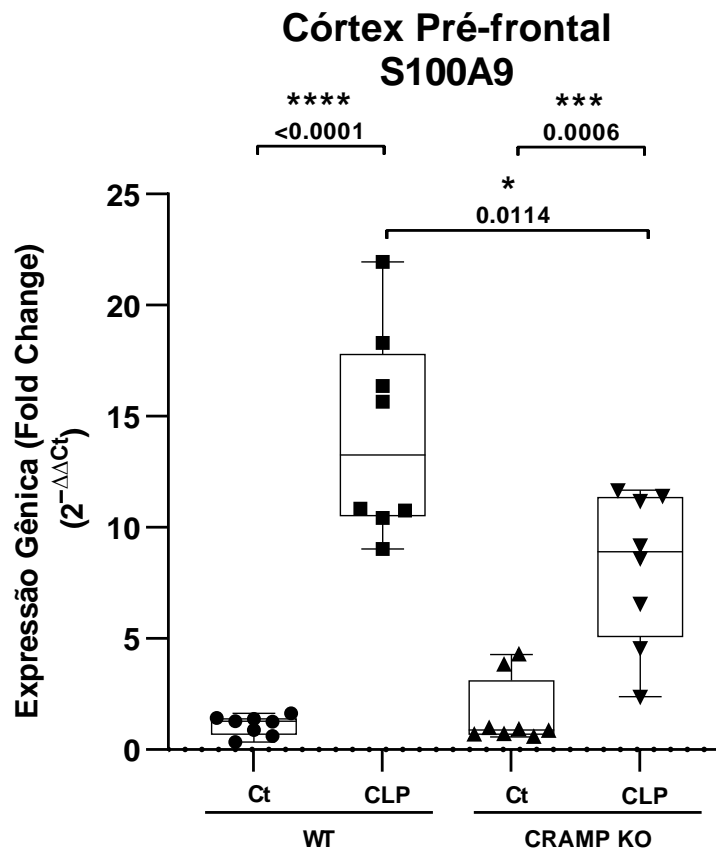
**Figura 5** - Análise da expressão gênica de S100A8 no hipocampo

Foi analisada a expressão gênica de S100A8 no hipocampo de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados via RT-qPCR. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

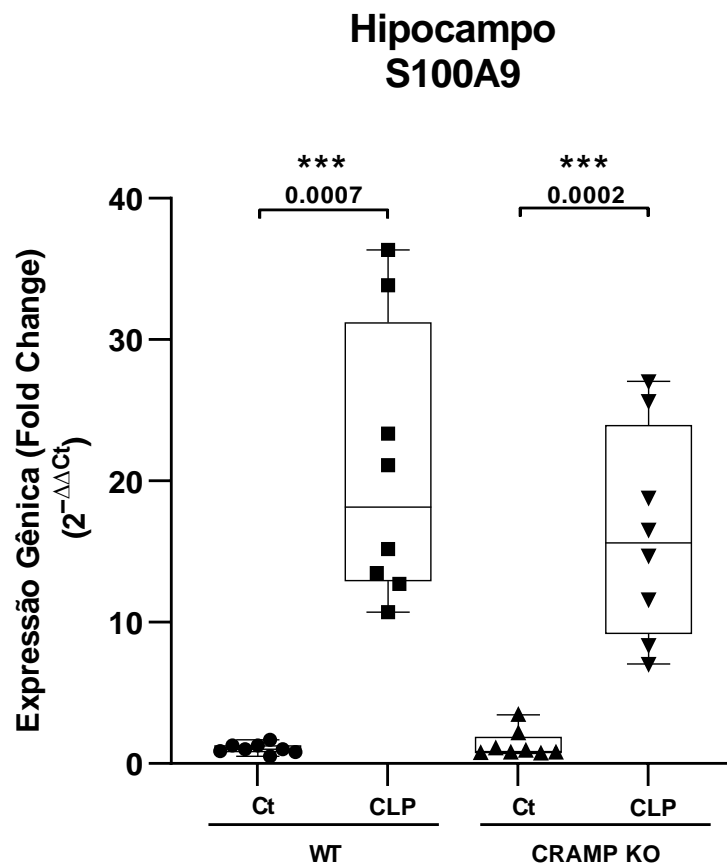
Ao realizar a quantificação da concentração de RNA mensageiro para a proteína S100A9 através do método de RT-qPCR no córtex pré-frontal, observamos aumento estatisticamente expressivo em sua transcrição quando comparamos animais que foram ao método de CLP aos seus controles, assim como foi observado para o RNA mensageiro de S1008. Da mesma forma, a expressão gênica em animais *wild-type*, quando submetidos a CLP foi estatisticamente superior aos animais *knockout* para o gene CRAMP (Figura 6).

No hipocampo destes mesmos animais, podemos observar um aumento também expressivo da expressão gênica em animais submetidos a CLP quando comparados com seus controles. Mas não houve uma diferença significativa entre grupos wild-type e CRAMP-*knockout* (Figura 7).

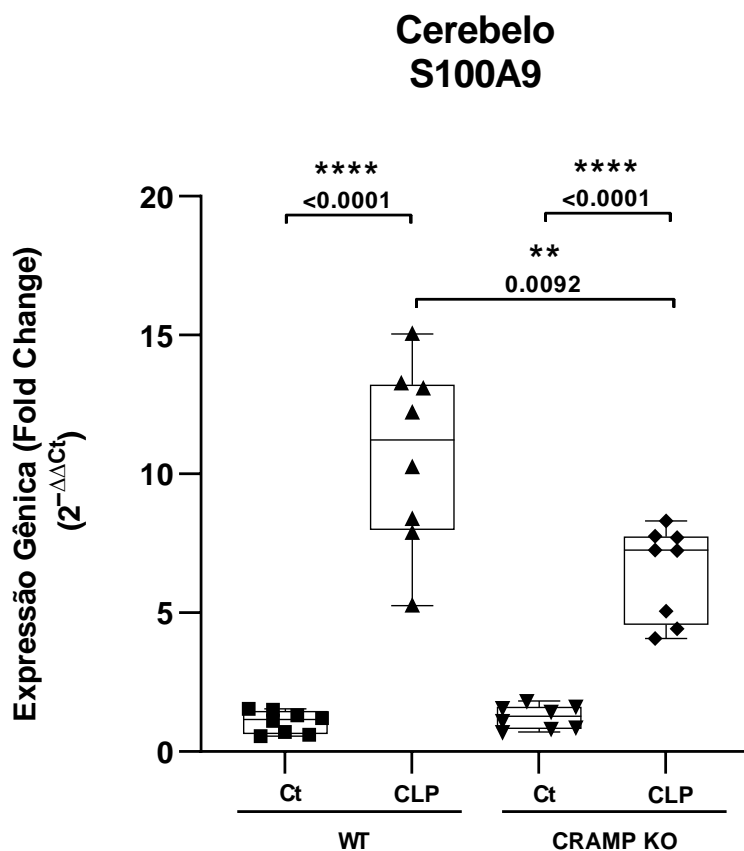
Já no cerebelo, quando avaliamos a expressão gênica de S100A9, observamos uma resposta semelhante a que ocorreu no córtex pré-frontal. Houve um aumento expressivo entre animais submetidos a CLP quando comparado com seus controles diretos, porém, observamos também um aumento estatisticamente significativo em animais expressando o gene CRAMP, sugerindo uma resposta inflamatória mais robusta (Figura 8).

**Figura 6** - Análise da expressão gênica de S100A9 no córtex pré-frontal

Foi analisada a expressão gênica de S100A9 no córtex pré-frontal de camundongos C57Bl/6 wild-type (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 wild-type (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados via RT-qPCR. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

**Figura 7** - Análise da expressão gênica de S100A9 no hipocampo

Foi analisada a expressão gênica de S100A9 no hipocampo de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados via RT-qPCR. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

**Figura 8** - Análise da expressão gênica de S100A9 no cerebelo

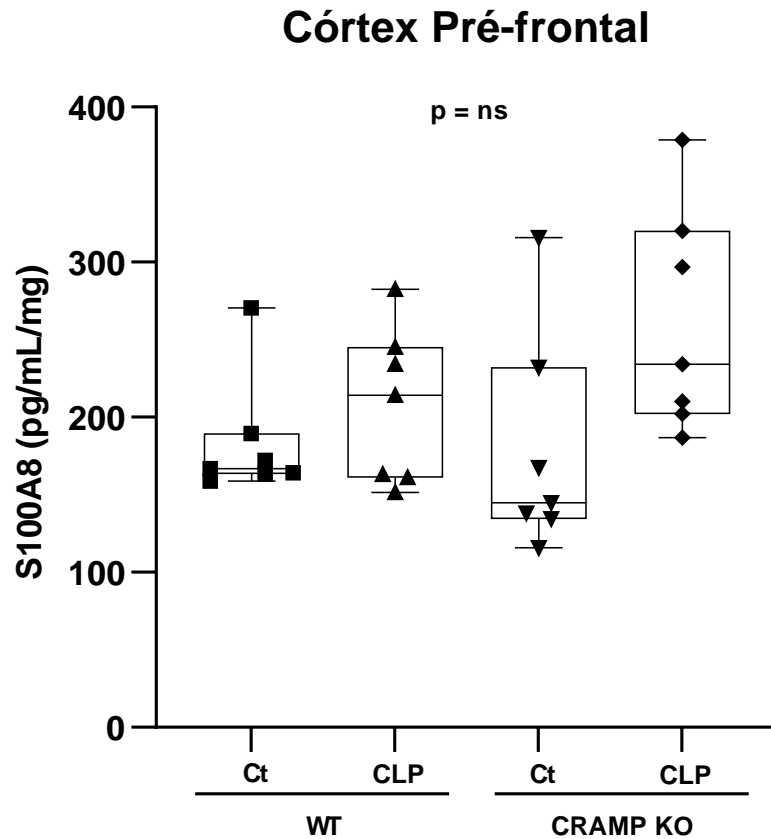
Foi analisada a expressão gênica de S100A9 no cerebelo de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados via RT-qPCR. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

Para validar nossos resultados, o mesmo experimento foi realizado em outros camundongos com a finalidade de quantificar as concentrações destas proteínas no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo, também como explorar o impacto da sepsse na microbiota intestinal.

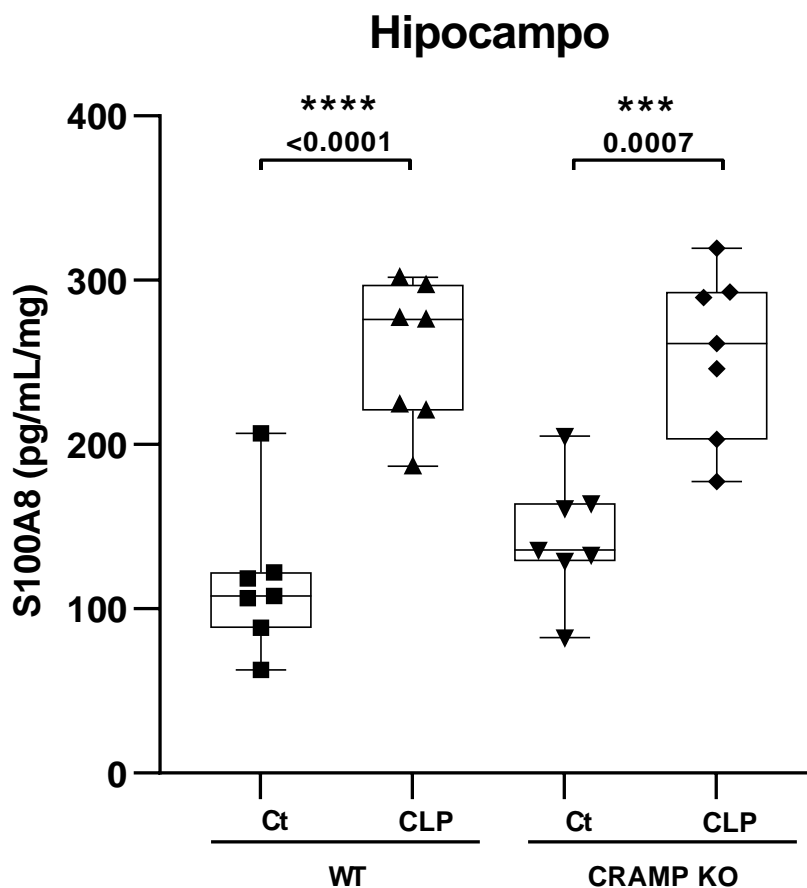
Inicialmente, o método de ELISA foi utilizado para quantificar a concentração da proteína S100A8 no córtex pré-frontal, no hipocampo e no cerebelo. No córtex pré-frontal, não foi possível observar diferença estatística entre nenhum dos grupos testados. É possível verificar um aumento de sua concentração nos grupos que foram submetidos a CLP em relação aos seus grupos controle, porém não foi atingida uma significância necessária. Fazendo uma comparação entre a mediana dos grupos que foram submetidos a CLP, não houve mudanças significativas relacionadas a ausência de CRAMP (Figura 9).

Entretanto, no hipocampo destes mesmos animais, pudemos ver uma diferença clara no perfil inflamatório se comparado os grupos que foram submetidos a CLP em relação aos seus grupos controle. Houve um aumento estatisticamente significativo na concentração de S100A8, evidenciando um aumento da resposta inflamatória. Porém, não houve diferença estatística entre grupos submetidos a CLP (Figura 10).

No cerebelo destes animais, observamos um aumento expressivo na concentração de S100A8 em animais *wild-type* quando submetidos a CLP, se comparados ao seu grupo controle. A mesma resposta não foi observada em animais *CRAMP-knockout*, onde não houve aumento significativo após a CLP. Houve um aumento basal da resposta inflamatória em animais *CRAMP-knockout*, se comparados a animais *wild-type*, apesar de não terem sido submetidos a nenhuma cirurgia (Figura 11).

**Figura 9** - Análise quantitativa de S100A8 no córtex pré-frontal.

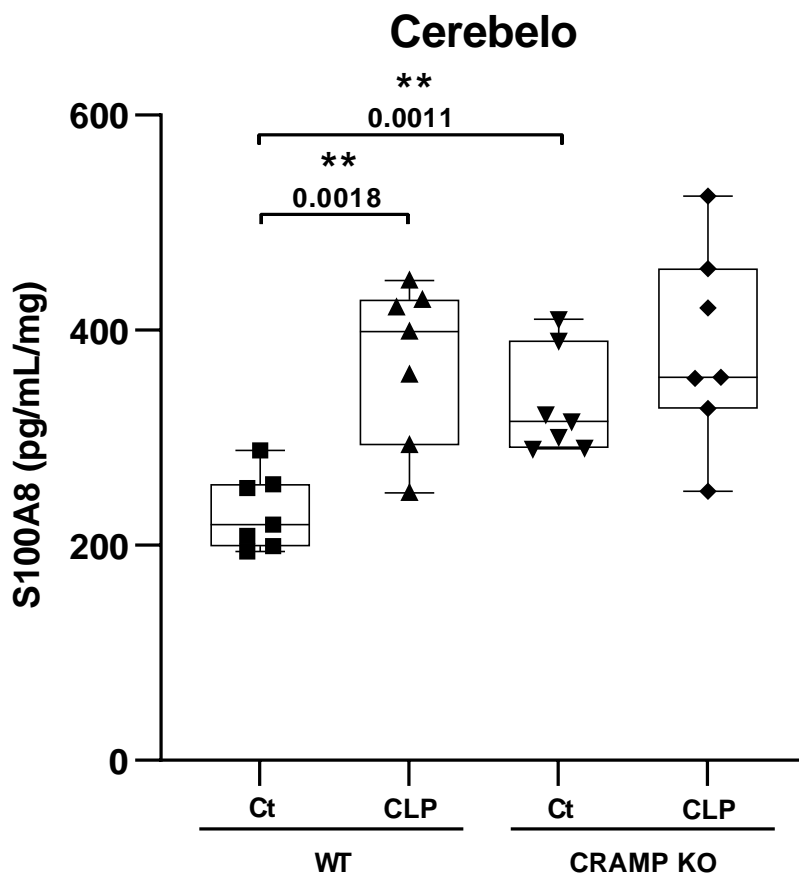
Foi avaliada a presença e a concentração da proteína S100A8 no córtex pré-frontal de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

**Figura 10** - Análise quantitativa de S100A8 no hipocampo

Foi avaliada a presença e a concentração da proteína S100A8 no hipocampo de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .



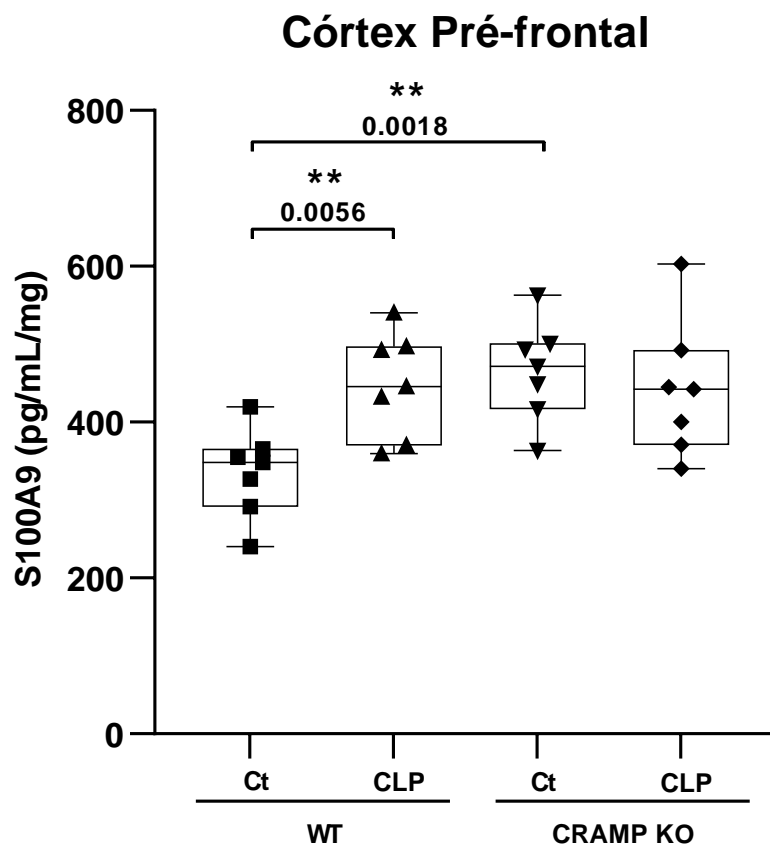
Figura 11 - Análise quantitativa de S100A8 no cerebelo



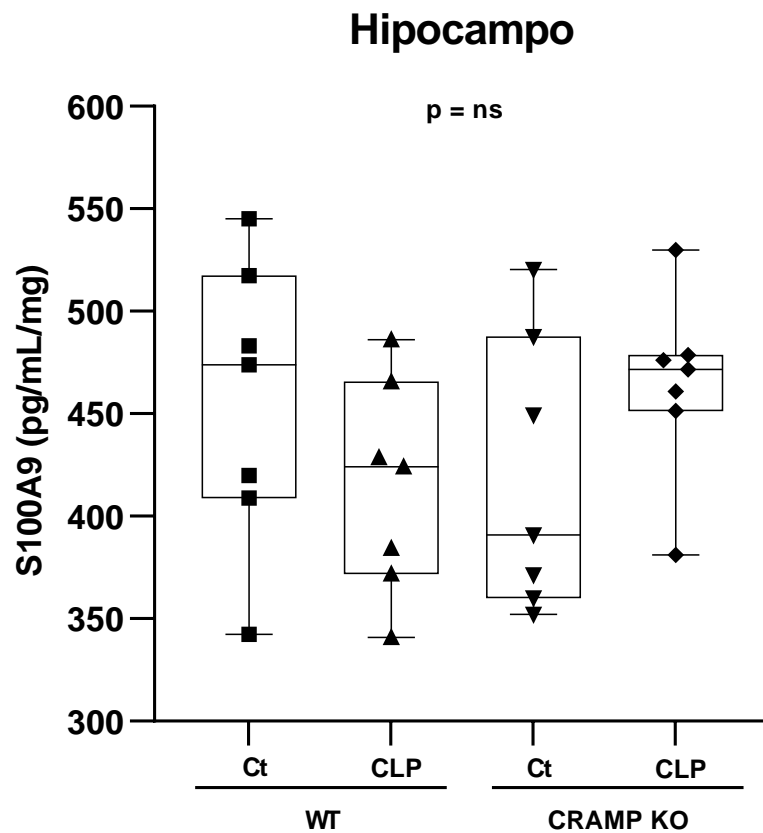
Foi avaliada a presença e a concentração da proteína S100A8 no córtex pré-frontal de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

Ao utilizar o método de ELISA para quantificar a concentração da proteína S100A9 no córtex pré-frontal, observamos um aumento estatisticamente significativo quando camundongos *wild-type* foram submetidos a CLP, se comparados com seu grupo controle. O mesmo não observado em animais *CRAMP-knockout*. Se compararmos os grupos controle de animais *wild-type* e *CRAMP-knockout*, observamos novamente um aumento da concentração basal de S100A9 em animais *CRAMP-knockout* (Figura 12).

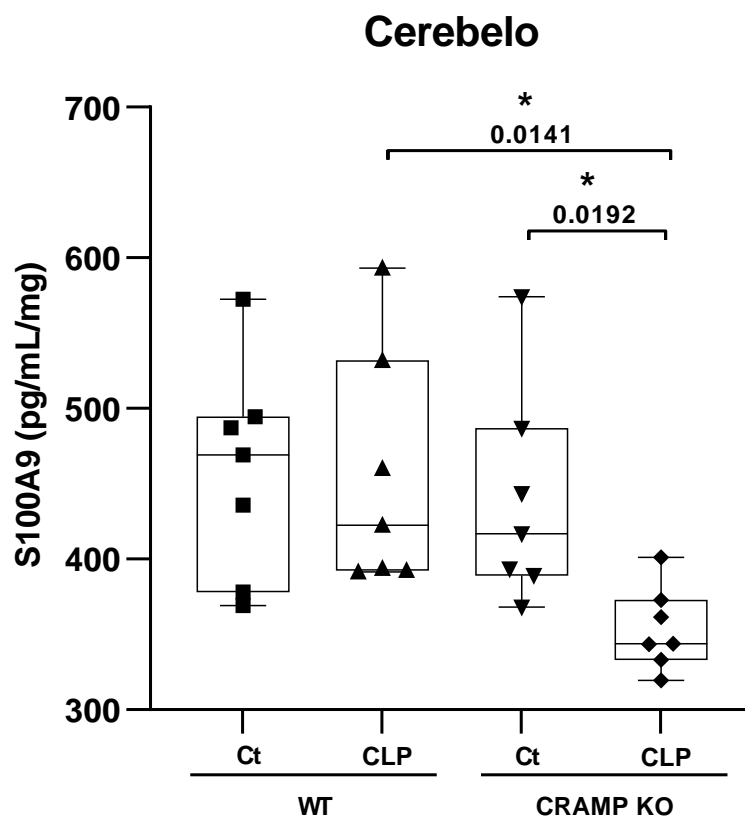
Não foi observada uma diferença estatística entre os grupos experimentais na concentração de S100A9 no hipocampo dos camundongos (Figura 13). Entretanto, no cerebelo dos camundongos, a indução de sepse via CLP em animais *CRAMP-knockout* diminuiu a concentração de S100A9 quando comparado ao seu grupo controle, evidenciando uma possível resposta anti-inflamatória. A mesma resposta foi observada em animais *CRAMP-knockout* quando comparados ao grupo *wild-type* quando também foi submetido a cirurgia (Figura 14).

**Figura 12** - Análise quantitativa de S100A9 no córtex pré-frontal

Foi avaliada a presença e a concentração da proteína S100A9 no córtex pré-frontal de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos à CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

**Figura 13** - Análise quantitativa de S100A9 no hipocampo

Foi avaliada a presença e a concentração da proteína S100A9 no hipocampo de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e *CRAMP-knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e *CRAMP-knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

**Figura 14** - Análise quantitativa de S100A9 no cerebelo

Foi avaliada a presença e a concentração da proteína S100A9 no cerebelo de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e *CRAMP-knockout* (CRAMP KO) que não foram submetidos a CLP (Ct) e camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e *CRAMP-knockout* (CRAMP KO) 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

Analisando o perfil da microbiota intestinal, observamos um aumento significativo de *E. coli* nas fezes de camundongos de ambos os grupos 24 horas após serem submetidos a CLP, se comparado aos seus controles diretos, 24 horas antes da indução da sepse. Após 24 horas da indução da sepse experimental, houve um aumento estatisticamente superior da população de *E. coli* em animais *wild-type* em comparação a *CRAMP-knockout* (Figura 15).

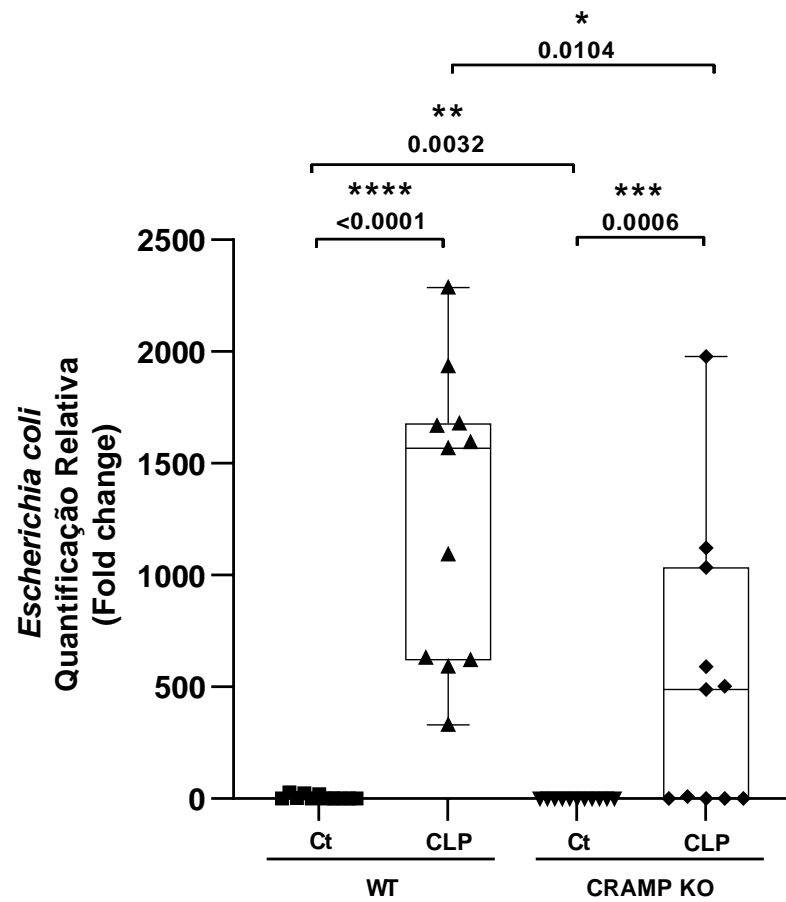
Já para *Lactobacillus spp.*, observamos um aumento de sua população em animais *wild-type* 24 horas após a CLP, o que não foi observado em animais *CRAMP-KO* (Figura 16). Não houve alteração significativa em sua população em animais *CRAMP-knockout* antes e após a sepse.

A população de *Clostridium coccooides* é estatisticamente superior em animais *wild-type* saudáveis se comparada com animais *CRAMP-knockout* em condições semelhantes. A realização da CLP ocasionou a diminuição da sua população em animais *wild-type*, enquanto não houve diferença significativa em animais *CRAMP-knockout* (Figura 17).

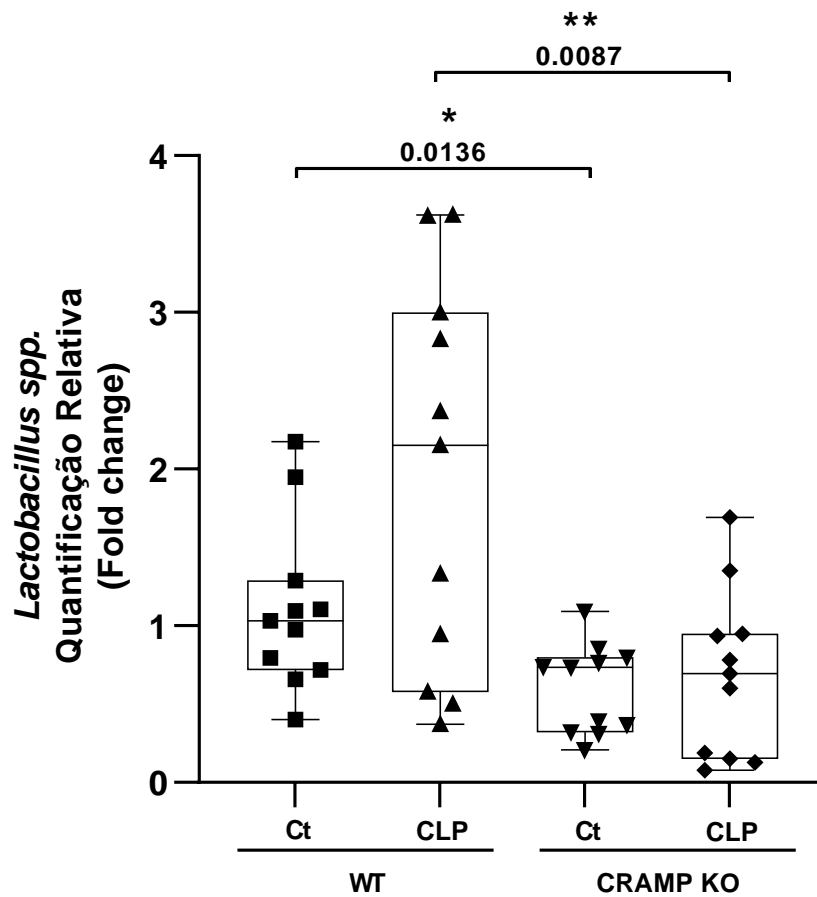
Houve uma queda estatisticamente significativa na população de *Enterococcus faecium* de animais *wild-type* após a CLP, mas essa queda foi possivelmente induzida pela presença de um *outlier* 24 horas antes da cirurgia. Não foi possível observar alterações em sua população nos outros grupos experimentais (Figura 18).

A população de *Enterococcus faecalis* é estatisticamente superior em animais *wild-type* saudáveis se comparado a animais *CRAMP-knockout* e houve um aumento expressivo de sua população nestes mesmos animais após a CLP. O mesmo aumento não foi observado após a CLP em animais *CRAMP-knockout* (Figura 19).

Já ausência de *CRAMP* aparentemente favoreceu a população de Bactérias Filamentosas Segmentadas, mas a CLP aparentemente não interferiu em suas populações (Figura 20).

**Figura 15** - Análise quantitativa da população de *Escherichia coli* em material fecal

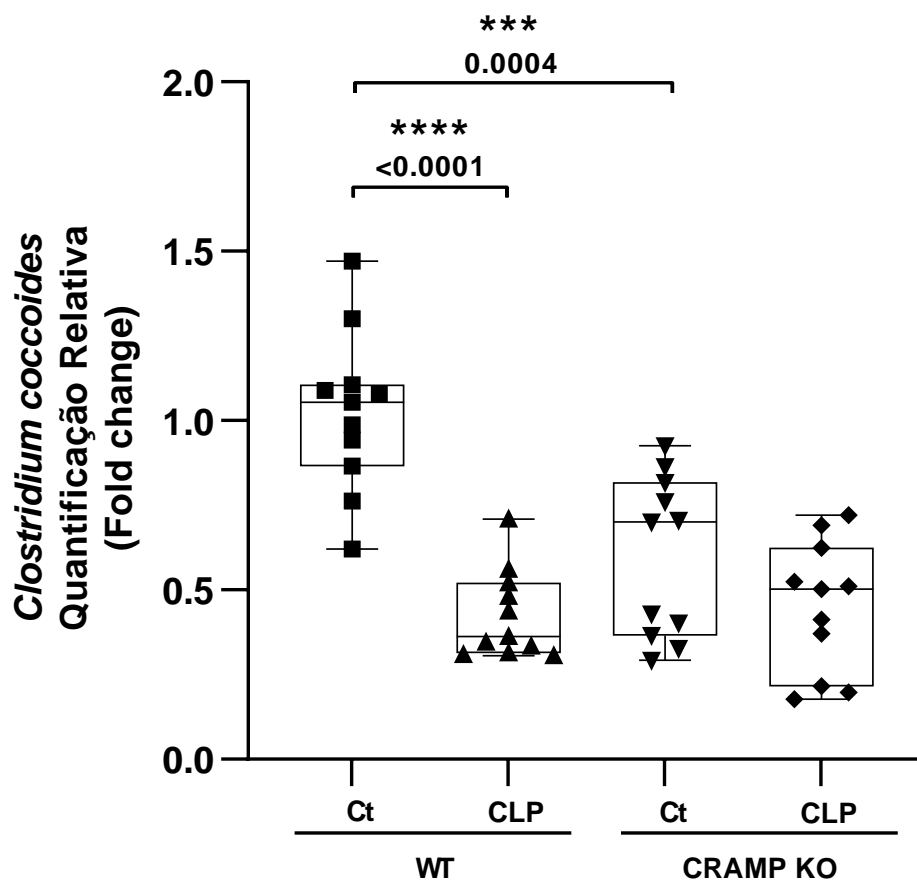
Foi avaliada a presença e a quantidade de *Escherichia coli* em material fecal de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e *CRAMP-knockout* (CRAMP KO) (Ct) 24h antes de terem sido submetidos a CLP e 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

**Figura 16** - Análise quantitativa da população de *Lactobacillus spp.* em material fecal

Foi avaliada a presença e a quantidade de *Lactobacillus spp.* em material fecal de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) (Ct) 24h antes de terem sido submetidos a CLP e 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

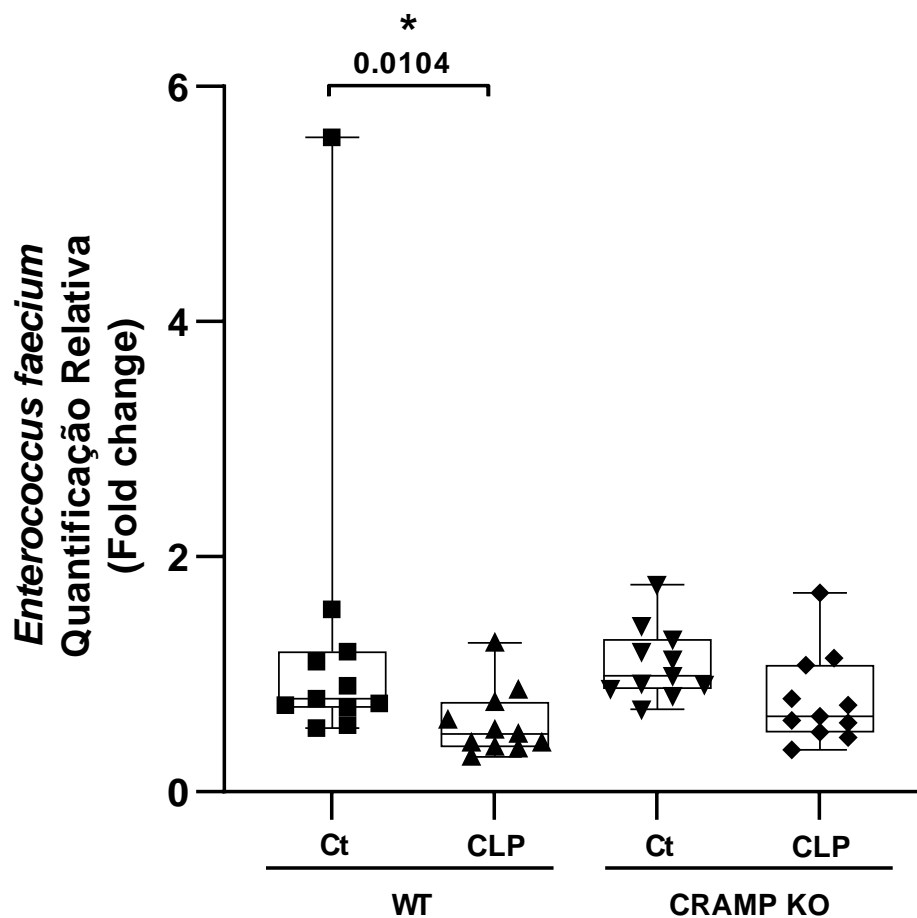


**Figura 17** - Análise quantitativa da população de *Clostridium coccoïdes* em material fecal



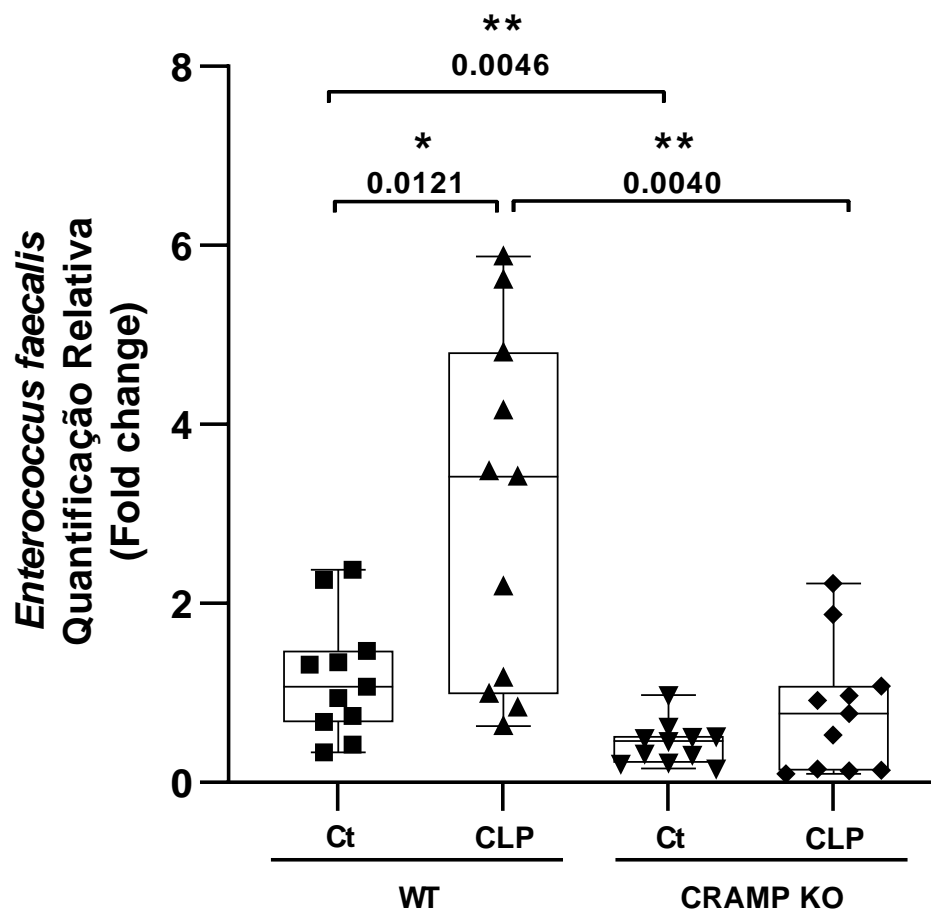
Foi avaliada a presença e a quantidade de *Clostridium coccoïdes* em material fecal de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) (Ct) 24h antes de terem sido submetidos a CLP e 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

**Figura 18** - Análise quantitativa da população de *Enterococcus faecium* em material fecal



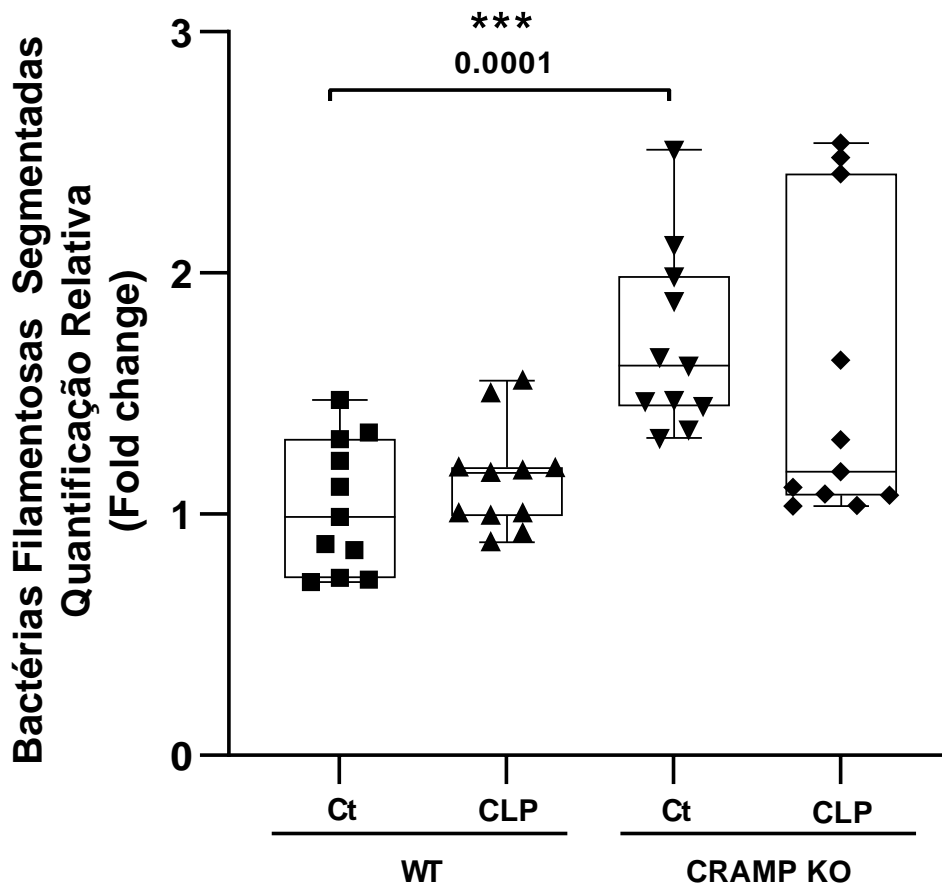
Foi avaliada a presença e a quantidade de *Enterococcus faecium* em material fecal de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e CRAMP-*knockout* (CRAMP KO) (Ct) 24h antes de terem sido submetidos a CLP e 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

**Figura 19** - Análise quantitativa da população de *Enterococcus faecalis* em material fecal



Foi avaliada a presença e a quantidade de *Enterococcus faecalis* em material fecal de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e *CRAMP-knockout* (CRAMP KO) (Ct) 24h antes de terem sido submetidos a CLP e 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

**Figura 20** - Análise quantitativa da população de Bactérias Filamentosas Segmentadas em material fecal



Foi avaliada a presença e a quantidade de Bactérias Filamentosas Segmentadas em material fecal de camundongos C57Bl/6 *wild-type* (WT) e *CRAMP-knockout* (CRAMP KO) (Ct) 24h antes de terem sido submetidos a CLP e 24h após serem submetidos a sepse experimental via CLP (CLP). Dados obtidos e quantificados através do ensaio de ELISA. Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0.05$ .

# *Discussão*



## 5 Discussão

Ao analisar a microbiota intestinal de animais CRAMP-*knockout* submetidos a CLP, houve diminuição da população de *Escherichia coli* se compararmos com o mesmo grupo de indivíduos *wild-type*, ao considerarmos o período de 24 horas após a cirurgia. O aumento de bactérias do filo Proteobacteria é um fenômeno descrito na literatura a partir do início da sepse, que se dá principalmente pelas espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo *E. coli* a causa mais comum de doenças intestinais e a principal responsável em um quadro de disbiose (Conway e Cohen, 2015; Katouli, 2010).

Este predomínio ocorre através de alternância, entre a diminuição da população de bactérias que predominam em uma microbiota saudável, como integrantes dos grupos Bacteroidetes e Firmicutes e o aumento exacerbado de bactérias do filo Proteobacteria (Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, et al., 2010).

Já para *Lactobacillus spp.*, houve uma diferença expressiva em sua quantificação se compararmos ambos os grupos submetidos a CLP. A ausência de CRAMP manteve os níveis populacionais próximos aos observados em animais que não sofreram intervenção. Em camundongos *wild-type*, houve um aumento dessa população após a cirurgia, porém sem significância estatística. Como evidenciou Kullar et al, 2023, *Lactobacillus* podem atuar eventualmente como patógenos oportunistas em algumas doenças sérias como endocardite, abscessos dentais e no fígado ou infecções de prótese no joelho, provocando uma bacteremia e sepse (Kulkarni e Khoury, 2014). A ausência de CRAMP ou o aumento concomitante de outros grupos bacterianos parecem inibir o crescimento de *Lactobacillus spp* no início da sepse.

Houve uma diminuição na população de *Clostridium coccoides* em animais *wild-type* submetidos a CLP, porém a níveis semelhante aos observados em animais CRAMP-*knockout*. A sepse experimental em animais CRAMP-*knockout* não resultou em um decréscimo dessa população comparado aos níveis pré-intervenção, permanecendo estável.

Não observamos diferença significativa em *Enterococcus faecium* e Bactérias Filamentosas Segmentadas quando comparamos os grupos *wild-type* e CRAMP-*knockout* submetidos a CLP, 24 horas após o procedimento. A população de *Enterococcus faecalis* aumentou significativamente após a CLP em animais *wild-type*, o que não foi observado em camundongos CRAMP-*knockout*.

Em resumo, a sepse induzida via CLP em animais *wild-type* favoreceu a proliferação de algumas espécies bacterianas, como *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* após 24 horas, como um leve aumento em *Lactobacillus spp.* Já a ausência de CRAMP não resultou no aumento de outras populações bacterianas além de *E. coli* 24 horas após a CLP, aparentemente retardando a progressão desses indivíduos no intestino de camundongos com sepse.

Em um estudo realizado previamente em nosso laboratório que avaliou a microbiota intestinal desses animais 8h após a CLP, mostrou que a proliferação de *E. coli* se inicia nos estágios iniciais da sepse em ambos os camundongos, *wild-type* e CRAMP-*knockout* (Almeida, 2018), porém o atraso na progressão desta população pôde ser evidenciado após 24 horas em animais CRAMP-*knockout*. Durante o período de 8 horas após a CLP não foi possível verificar significância estatística entre os grupos. Nesse contexto, a ausência do gene CRAMP parece induzir um efeito controlador da microbiota intestinal, retardando a proliferação de *Escherichia coli* e mantendo a população de *Enterococcus faecalis* muito próxima ao observado em animais que não foram submetidos a cirurgia.

Severino et al., 2017, demonstrou um aumento da infiltração de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos CRAMP-*knockout* 24 horas após a CLP, quando comparados com animais *wild-type*. A porcentagem de células viáveis também era superior em animais CRAMP-*knockout*, com taxa de células apoptóticas consideravelmente inferior quando comparadas aos camundongos *wild-type*.

Neste mesmo estudo, foi demonstrado que, após 8h do início da sepse, houve uma resposta imunológica inata mais robusta em animais CRAMP-*knockout*. Houve um aumento dos níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e MCP-1, mas não houve diferença em TNF- $\alpha$  e IL-10. Dessa forma, podemos inferir que houve uma resposta inflamatória compensatória, aumentando o perfil pro-inflamatório através de outras vias. Estes animais CRAMP-*knockout* tiveram uma sobrevida superior aos animais

*wild-type*. Esta pode ser a principal razão de observamos uma diminuição na proporção de *E. coli*, *Lactobacillus spp.* e *Enterococcus faecalis* na microbiota de camundongos CRAMP-*knockout* 24 horas após a CLP, através do aumento no recrutamento de monócitos e neutrófilos para o foco principal da inflamação (Singer et al., 2018).

CRAMP possui um amplo papel na sinalização de diversos processos imunes. A ativação de NF- $\kappa$ B induz a produção intracelular e a liberação extracelular do peptídeo CRAMP, que é fundamental por desencadear a degradação de bactérias fagocitadas via autofagia (Chen et al., 2021). Alguns produtos celulares bacterianos, como lipopolissacarídeos e peptidoglicanos induzem a produção e liberação de CRAMP através da ativação da via de sinalização mediada por TLR4 (Li et al., 2009) Outra via possível de ativação de CRAMP é pelo resultado da degradação de bactérias fagocitadas, acarretando a liberação de DNA bacteriano no meio extracelular e conseqüentemente a ativação de TLR9, através da fosforilação de ERK (Koon et al., 2011).

Para compreender quais genes poderiam estar sendo expressos na ausência de CRAMP, em um contexto de sepse, Severino et al., 2017 demonstrou, através da análise global de genes expressos, que houve uma regulação aumentada de genes relacionados a quimiotaxia e migração de leucócitos, entre eles S100A8 e S100A9.

Os resultados obtidos através da análise de expressão gênica em animais *wild-type* submetidos a CLP, evidenciou um aumento significativo da presença de RNAm para as proteínas S100A8 e S100A9 no córtex pré-frontal, no hipocampo e no cerebelo, se comparados ao seu controle, que não sofreu intervenção cirúrgica.

Entretanto, após 24 horas do início da sepse, observamos que houve uma diferença no perfil de expressão gênica, com a diminuição da expressão de S100A8 e S100A9 em animais CRAMP-*knockout* quando comparada com animais *wild-type*. Evidenciando uma possível diminuição da neuro inflamação.

Através do teste de ELISA, verificamos que o perfil de expressão gênica após 24 horas da realização do modelo de CLP, não resultou na tradução dessas proteínas em algumas regiões cerebrais. S100A8, por exemplo, não demonstrou diferença estatística entre os grupos quando observamos o córtex pré-frontal. No hipocampo, verificamos um aumento da lesão tecidual em ambos os grupos submetidos à CLP,



mas sem diferença estatística entre animais *wild-type* e *CRAMP-knockout*. E o cerebelo de animais *wild-type*, do grupo controle, possui uma quantidade estatisticamente inferior de S100A8 se comparado aos outros grupos estudados.

Para S100A9, os animais submetidos a CLP apresentaram perfis pro-inflamatórios semelhantes, apesar de apenas o grupo os animais *wild-type* apresentarem maior lesão tecidual se comparados ao seu controle. Não houve diferença estatística entre o pré- e pós-operatório de animais *CRAMP-knockout*. Não houve lesão tecidual significativa no hipocampo dos animais testados nos quatro grupos. A ausência do gene CRAMP favoreceu um possível perfil anti-inflamatório no cerebelo dos camundongos.

Um outro trabalho realizado paralelamente em nosso laboratório demonstrou um aumento significativo de IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  no plasma, após 24 horas desses animais serem submetidos a CLP, sem alteração significativa entre os grupos *wild-type* e *CRAMP-knockout*. Porém, para a IL-6 e MCP-1, foi observada uma resposta mais intensa em animais *wild-type* do que em animais *CRAMP-knockout* (Flores, 2022). Desta maneira, houve uma alteração do perfil da resposta imunológica entre os grupos testados, mostrando que a resposta pro-inflamatória foi mais proeminente em animais *CRAMP-knockout* 8 horas após a cirurgia de CLP, porém, mais importante em animais *wild-type* após 24 horas do início da sepse.

Esses resultados evidenciam que a ausência do gene CRAMP desencadeia uma resposta pró-inflamatória mais importante no início da sepse, controlando a infecção de uma maneira mais eficiente e proporcionando uma sobrevivência maior aos animais *CRAMP-knockout*.

Desta forma, não foi possível observar de que maneira CRAMP pode estar protegendo os animais de possíveis danos cerebrais no curso inicial da doença e garantindo um melhor desfecho, sem sequelas neurológicas. Novos estudos são necessários para compreender esse cenário considerando variáveis como tempo do curso da doença, comparação entre animais jovens e idosos, como também outros possíveis marcadores moleculares que estejam diretamente implicados em dano ao sistema nervoso central. A ausência de CRAMP foi capaz de influenciar diretamente no curso da resposta imunológica inata, induzindo uma resposta mais robusta, e

controlando de maneira mais eficaz a microbiota intestinal, retardando o processo de disbiose.

# *Conclusões*



## 6 Conclusões

A realização da cirurgia para sepse experimental em camundongos *wild-type* resultou em um aumento significativo da população de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* e uma leve elevação para *Lactobacillus spp.* após 24 horas. Já a deficiência em CRAMP resultou no retardo da progressão de *Escherichia coli* e um melhor controle de outras populações bacterianas, mantendo-as em níveis semelhantes aos observados pelo grupo controle.

Apesar de S100A8 e S100A9 possuírem um aumento estatisticamente relevante em sua expressão gênica em animais *wild-type* quando comparados a animais CRAMP-*knockout* após a CLP, o mesmo resultado não refletiu na tradução e na concentração final destas proteínas. Resultado este que pode ter sido influenciado pelo tempo de avaliação da resposta imunológica escolhido, 24 horas, ou a utilização de animais jovens. Novos ensaios com janelas de tempo diferentes e utilização de animais com idade mais avançada podem ajudar a elucidar o papel de CRAMP em um contexto de sepse.

Desta forma, não foi possível avaliar qual o impacto de CRAMP no sistema nervoso central 24 horas após o início da sepse e qual sua influência direta no desfecho destes animais.

*Anexos*



## 7 Anexos

### Anexo A – Certificado de aprovação do CEUA/FMUSP para a utilização de animais ao projeto 1288/2019



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

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Investigação do eixo cérebro-intestinal em camundongos CRAMP knockout submetidos a modelo experimental de sepse” registrada com o nº 1288/2019, sob a responsabilidade de Fabiano Pinheiro da Silva e Ewerton Vinicius Macarini Bruzaferro, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 18.04.2019

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-05-2019 Término: 01-03-2023
Espécie/linhagem/raça	CAMUNDONGO
Nº de animais	30 C57Bl/6 e 30 camundongos CRAMP/KO
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 18 de Abril de 2019

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

**Anexo B – Certificado de aprovação do CEUA/FMUSP para a inclusão de animais ao projeto 1288/2019**



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 17/09/2020, **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **1288/2019** intitulado “**Investigação do eixo cérebro-intestinal em camundongos CRAMP knockout submetidos a modelo experimental de sepse**” apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

- Inclusão de **20** camundongos C57BI/6, machos, com 7 semanas
- Inclusão de **20** camundongos CRAMP *knockout*, machos com 7 semanas.

Pesquisador Responsável: **Fabiano Pinheiro da Silva**

CEUA-FMUSP, 17 de setembro de 2020

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

# *Referências Bibliográficas*





## 8 Referências Bibliográficas

Aijaz S, Balda MS, Matter K. Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol* 2006; 248: 261-98.

Almeida, Marta Lucia de. Investigação do microbioma intestinal em camundongos deficientes em CRAMP submetidos   sepsis experimental [disserta o]. São Paulo: Universidad de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2018 [citado 2024-02-05]. doi:10.11606/D.5.2019.tde-16042019-141828.

Barbeiro DF, Koike MK, Coelho AM, Pinheiro Da Silva F, Cesar Machado MC. Intestinal barrier dysfunction and increased COX-2 gene expression in the gut of elderly rats with acute pancreatitis. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology* 2015.

Barbeiro DF, Barbeiro HV, Zampieri FG, Cesar Machado MC, Torggler FF, Gomes CDM, Goulart AC, Velasco IT, Monteiro Da Cruz NL, Possolo De Souza H et al (2013) Cathelicidin LL-37 bloodstream surveillance is down regulated during septic shock. *Microbes Infect* 15:342–346.

Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, Deng Y, Blennerhassett P, Macri J, McCoy KD, Verdu EF, Collins SM. The intestinal microbiota affects central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*. 2011 Aug;141(2):599-609, 609.e1-3.

Brandenburg LO, Jansen S, Wruck CJ, Lucius R, Pufe T. Antimicrobial peptide rCRAMP induced glial cell activation through P2Y receptor signaling pathways. *Mol Immunol*. 2010 Jun;47(10):1905-13.

Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 16050–16055, 2011.

Chakraborty K, Maity PC, Sil AK, Takeda Y, Das S. cAMP stringently regulates human cathelicidin antimicrobial peptide expression in the mucosal epithelial cells by activating cAMP-response element-binding protein, AP-1, and inducible cAMP early repressor. *J Biol Chem*. 2009 Aug 14;284(33):21810-27.

Chen K, Yoshimura T, Gong W, Tian C, Huang J, Trinchieri G, Wang JM. Requirement of CRAMP for mouse macrophages to eliminate phagocytosed *E. coli* through an autophagy pathway. *J Cell Sci*. 2021 Mar 8;134(5):jcs252148. doi: 10.1242/jcs.252148. PMID: 33468624; PMCID: PMC7970306.

Christensen DP & Hutkins RW. (1992). Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Applied and Environment Microbiology*, 58(10), 3312–3315.

Chromek M, Slamova Z, Bergman P, Kovacs L, Podracka L, Ehren I, Hokfelt T, Gudmundsson GH, Gallo RI, Agerberth B, Brauner A. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):636-41.

Chung HY, Wickel J, Brunkhorst FM, Geis C. Sepsis-Associated Encephalopathy: From Delirium to Dementia? *J Clin Med*. 2020 Mar 5;9(3):703.

Clarke G, Grenham S, Scully P *et al*. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 18, 666–673 (2013).

Conway T, Cohen PS. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr*. 2015 Jun;3(3): 10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014. PMID: 26185077; PMCID: PMC4510460.

Cryan JF, O'riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, Codagnone MG, Cusotto S, Fulling C, Golubeva AV, Guzzetta KE, Jaggar M, Long-Smith CM, Lyte JM, Martin JA, Molinero-Perez A, Moloney G, Morelli E, Morillas E, O'connor R, Cruz-Pereira JS, Peterson VI, Rea K, Ritz NI, Sherzin E, Spichak S, Teichman EM, Van De Wouw M, Ventura-Silva AP, Wallaec-Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G, Dinan TG. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev*. 2019 Oct 1;99(4):1877-2013.

Da Silva FP, Machado MCC. Antimicrobial peptides: Clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*, 308-314; 2012.

Dheer R, Santaolalla R, Davies JM, *et al*. Intestinal epithelial TLR4 signaling affects epithelial function, colonic microbiota and promotes risk for transmissible colitis. *Infection Immun* 2016.

Diaz Heijitz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Bjorkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forssberg H, Pettersson S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 : 3047–3052, 2011.

Dicks LMT, Dreyer L, Smith C, & Van Staden AD. (2018). A review: The fate of bacteriocins in the human gastro-intestinal tract: Do they cross the gut-blood barrier? *Frontiers in Microbiology*, 9, 2297.

Doring Y, Drechsler M, Wantha S, Kemmerich K, Lievens D, Vijayan S, Gallo RL, Weber C, Soehnlein O. Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ Res*. 2012 Apr 13;110(8):1052-6.

Durr UH, Sudheendra US & Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1408–1425 (2006).

Erny D, Hrabec De Angelis A, Jaitin D *et al*. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 18, 965–977 (2015).

Febriza A, Hatta M, Natzir R, Kasim VNA, Idrus HH. Activity of Antimicrobial Peptide; Cathelicidin, on Bacterial Infection. *Open Biochem. J*.13: 45–53 (2019).

Flores IP. Efeito das catelicidinas na neuroinflamação tardia em modelo experimental de sepse [Internet]. 2022 ;[citado 2024 fev. 05 ] Available from: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5164/tde-17012023-200833/>.

Frasca L, Lande R. Role of defensins and cathelicidin LL37 in auto-immune and auto-inflammatory diseases. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Aug ;13(10) :1882-97.

Garcia-Gutierrez E, Mayer MJ, Cotter PD & Narbad A. (2019). Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes*, 10(1), 1–21.

Gofton TE, Young GB. Sepsis-associated encephalopathy. *Nat Rev Neurol*. 2012 Oct;8(10):557-66.

Gotz T, Gunther A, Witte OW, Brunkhorst FM, Seidel G, Hamzei F. Long-term sequelae of severe sepsis: cognitive impairment and structural brain alterations - an MRI study (LossCog MRI). *BMC Neurol*. 2014 Jul 15; 14:145.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003 Jan 9;348(2):138-50.

Huang LC, Reins RY, Gallo RL, Mcdermott AM. Cathelicidin-deficient (Cnlp -/-) mice show increased susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Oct;48(10):4498-508.

Hugon P, Dufour JC, Colson P, Fournier PE, Sallah K, Raoult D. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Infect Dis*. 2015 Oct;15(10):1211-1219.

Iimura M, Gallo RL, Hase K, Miyamoto Y, Eckmann L, Kagnoff MF. Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens. *J Immunol*. 2005 Apr 15;174(8):4901-7.

Janda E, Boi L, Carta AR. Microglial phagocytosis and its regulation: a therapeutic target in Parkinson's disease? *Front Mol Neurosci*. (2018) 11:144.

Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, 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.

Katouli M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iran J Microbiol*. 2010 Jun;2(2):59-72. PMID: 22347551; PMCID: PMC3279776.

Koon HW, Shih DQ, Chen J, Bakirtzi K, Hing TC, Law I, Ho S, Ichikawa R, Zhao D, Xu H, Gallo R, Dempsey P, Cheng G, Targan SR, Pothoulakis C. Cathelicidin signaling via the Toll-like receptor protects against colitis in mice. *Gastroenterology*. 2011 Nov;141(5):1852-63.e1-3. doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.079. Epub 2011 Jul 14. PMID: 21762664; PMCID: PMC3199285.

Kulkarni HS, Khoury CC. Sepsis associated with *Lactobacillus* bacteremia in a patient with ischemic colitis. *Indian J Crit Care Med*. 2014 Sep;18(9):606-8. doi: 10.4103/0972-5229.140152. PMID: 25249745; PMCID: PMC4166876.

- Kullar, Ravina, Ellie J. C. Goldstein, Stuart Johnson, and Lynne V. McFarland. 2023. "Lactobacillus Bacteremia and Probiotics: A Review" *Microorganisms* 11, no. 4: 896.
- Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009;30(3):131-141.
- Li, G., Domenico, J., Jia, Y., Lucas, J. J. and Gelfand, E. W. (2009). NF- $\kappa$ B-dependent induction of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine mast cells by lipopolysaccharide. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 150, 122-132. 10.1159/000218115
- Ma L, Sun P, Zhang JC, Zhang Q, Yao SL. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *Int J Mol Med.* 2017 Jul;40(1):31-38. doi: 10.3892/ijmm.2017.2987. Epub 2017 May 12. PMID: 28498464; PMCID: PMC5466387.
- Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 2014;5(1):4-11.
- Napolitano LM. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surg Infect (Larchmt).* 2018 Feb/Mar;19(2):117-125. doi: 10.1089/sur.2017.278. PMID: 29447109.
- O'mahony SM, Felice VD, Nally K, Savignac HM, Claesson MJ, Scully P, Woznicki J, Hyland NP, Shanahan F, Quigley EM, Marchesi JR, O'toole PW, Dinan TG, Cryan JF. Disturbance of the gut microbiota in early-life selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats. *Neuroscience.* 2014 Sep 26 ;277 :885-901.
- Pinheiro Da Silva F, Machado MCC. Septic Shock and the Aging Process: A Molecular Comparison. *Front Immunol.* 2017 Oct 25; 8:1389.
- Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, Nardelli A, Bolino C, Lau JT, Martin FP, Cominetti O, Welsh C, Rieder A, Traynor J, Gregory C, De Palma G, Pigrau M, Ford AC, Macri J, Berger B, Bergonzelli G, Surette MG, Collins SM, Moayyedi P, Bercik P. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology.* 2017 Aug;153(2):448-459.e8.
- Senthil M, Brown M, Xu DZ, Lu Q, Feketeova E, Deitch EA. Gutlymph hypothesis of systemic inflammatory response syndrome/ multiple-organ dysfunction syndrome: validating studies in a porcine model. *J Trauma* 2006; 60(5): 958-65; discussion 65-7.
- Severino P, Ariga SK, Barbeiro HV, De Lima TM, De Paula Silva E, Barbeiro DF, Machado MCC, Nizet V, Pinheiro Da Silva F. Cathelicidin-deficient mice exhibit increased survival and upregulation of key inflammatory response genes following cecal ligation and puncture. *J Mol Med (Berl).* 2017 Sep;95(9):995-1003.
- Shahnawaz M & Soto C. (2012). Microcin amyloid fibrils A are reservoir of toxic oligomeric species. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 11665–11676.

Singer BH, Dickson RP, Denstaedt SJ, Newstead MW, Kim K, Falkowski NR, Erb-Downward JR, Schmidt TM, Huffnagle GB, Standiford TJ. Bacterial Dissemination to the Brain in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Mar 15;197(6):747-756. doi: 10.1164/rccm.201708-1559OC. PMID: 29232157; PMCID: PMC5855074.

Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*. 2001 Jun 15;97(12):3951-9.

Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558: 263–275, 2004.

Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* 34:73–82, 2004.

Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, Viale A, Socci ND, van den Brink MR, Kamboj M, Pamer EG. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*. 2010 Dec;120(12):4332-41. doi: 10.1172/JCI43918. Epub 2010 Nov 22. PMID: 21099116; PMCID: PMC2993598.

Vandamme D. et al., A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cellular Immunology*, 22-35; 2012.

Vasilchenko AS & Valyshev AV (2019). Pore-forming bacteriocins: Structural-functional relationships. *Archives of Microbiology*, 201(2), 147–154.

Verdu EF, Bercik P, Huang XX, Lu J, Al-Mutawaly N, Sakai H, Tompkins TA, Croitoru K, Tsuchida E, Perdue M, Collins SM. The role of luminal factors in the recovery of gastric function and behavioral changes after chronic *Helicobacter pylori* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Oct;295(4): G664-70.

Verjans ET, Zels S, Luyten W, Landuyt B, Schoofs L. Molecular mechanisms of LL-37-induced receptor activation: An overview. *Peptides*. 2016 Nov; 85:16-26.

Wang G, Human antimicrobial peptides and proteins, *Pharmaceuticals* 7 (5) (2014) 545–594.

Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol*. 2018 Jun 11;9:1298. doi: 10.3389/fimmu.2018.01298. PMID: 29942307; PMCID: PMC6004386.

Zampieri FG et al. Sepsis-associated encephalopathy: not just delirium. *Clinics, São Paulo*, v. 66, n. 10, p. 1825-1831, 2011.