

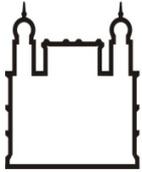
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

Análise do Fenótipo Imunometabólico de Monócitos na Sepsé

Pedro Mendes de Azambuja Rodrigues

Rio de Janeiro

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Pedro Mendes de Azambuja Rodrigues

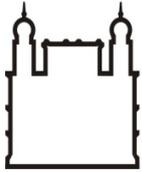
Análise do Fenótipo Imunometabólico de Monócitos na Sepsé

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

Rio de Janeiro

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Pedro Mendes de Azambuja Rodrigues

Análise do Fenótipo Imunometabólico de Monócitos na Sepsé

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

Aprovada em: 03/ 12/ 2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes - Presidente

Prof. Dr. Helder Takashi Imoto Nakaya

Prof. Dr. André Miguel Japiassu

Prof. Dr. Flavio Alves Lara – Revisor e Suplente

Prof. Dr. Fábio César Sousa Nogueira - Suplente

Rio de Janeiro

2018

A Miguel (o pequeno cientista), Julia, Paulo e Regina

FICHA CATALOGRÁFICA

Mendes de Azambuja Rodrigues, Pedro.

Análise do Fenótipo Imunometabólico de Monócitos na Sepsé / Pedro Mendes de Azambuja Rodrigues. - Rio de Janeiro, 2018.
xiv, 95f f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Fernando Augusto Bozza.

Bibliografia: f. 76-91

1. Sepsé. 2. Monócitos. 3. Metabolismo energético. 4. Inflamação. 5. Pacientes Internados. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Fernando Bozza pela orientação, inspiração, ideias... e paciência.

À Dra. Monique Trugilho, um encontro inusitado e muito feliz que tive nesse período, por compartilhar o seu conhecimento com generosidade e entusiasmo, mudando o rumo do projeto para melhor.

Ao Dr. Richard Valente e à Dra. Ana Gisele Ferreira (LATOX – IOC) pelas valiosas contribuições no desenho experimental e análises do experimento de proteômica *shotgun*, realizado na Plataforma de Proteômica da FIOCRUZ – RJ.

Aos colaboradores do experimento de SRM: Dra. Gisele Brunoro, pela parceria e incentivo, Dr. Fabio Nogueira, por nos receber em colaboração no Instituto de Química da UFRJ e supervisionar os experimentos, e Gabriel Reis, que operou as aquisições, realizadas no LADETEC - UFRJ.

Ao Dr. Helder Nakaya e Mariana Pereira, pela recepção no Laboratório de Biologia de Sistemas Computacional (USP), pelos *insights* sobre dados em larga escala e pela análise dos dados apresentada na figura 4.7.

Aos colegas talentosos que ajudaram na bancada: Dr. André Costa, nos experimentos de culturas de células e Kemily Toledo, no preparo das amostras para os experimentos de proteômica.

Aos colegas que ajudaram, em meio à rotina atribulada das UTIs, na inclusão dos pacientes, dentre os quais destaco: Dr. Marcos Knibel, Christian Roderjan e Antônio Martins (Hospital São Lucas), Carolina Siqueira (Hospital Copa D`or) e Dr. André Japiassu (INI).

Ao Dr. Flavio Lara, pela revisão do manuscrito.

Ao Dr. Hugo Caire, Dra. Patricia Bozza e todos os colegas do Laboratório de Imunofarmacologia. Foi um privilégio conviver e ser motivado pelo seu conhecimento, engenhosidade e espírito de equipe.

À minha família pelo suporte e carinho que tornaram possível a conclusão dessa etapa.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O conceito e definições de sepse.....	1
1.2 O problema clínico da sepse.....	6
1.3. Fisiopatologia da sepse.....	13
1.4. Ômicas moleculares no estudo da sepse.....	21
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 População do estudo.....	26
3.2 Isolamento de monócitos.....	26
3.3 Estímulo <i>in vitro</i> com LPS.....	27
3.4 Citometria de fluxo.....	27
3.4.1 Expressão de HLA-DR e GLUT-1 na superfície de monócitos.....	28
3.4.2 Ensaio de captação de glicose.....	28
3.5 Mensuração de ATP e lactato.....	29
3.6 Proteômica shotgun.....	30
3.6.1 Preparo das amostras.....	30
3.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	31
3.6.3 Análise por espectrometria de massas.....	31
3.6.4 Identificação de peptídeos e inferência de proteínas.....	34
3.6.5 Análise das proteínas diferencialmente reguladas.....	36
3.7 Proteômica dirigida pela técnica de monitoramento de reação selecionada (SRM)	36
3.7.1 Desenvolvimento do ensaio de SRM.....	36
3.7.2 Análise por espectrometria de massas.....	39
3.7.3 Análise quantitativa.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Efeito da ativação de celular sobre o metabolismo glicolítico.....	41
4.2 Expressão de HLA-DR em pacientes com sepse.....	43
4.3 Análise proteômica de monócitos de pacientes com sepse.....	44
4.3.1 Proteômica <i>shotgun</i>	47
4.3.2 Proteômica dirigida.....	58
5 DISCUSSÃO.....	62
5.1 Ensaio de ativação <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	63
5.2 Expressão de HLA-DR em monócitos de pacientes.....	67
5.3 Estudos proteômicos.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXO I.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Curvas de sobrevivência representativas da sepse.....	12
Figura 1.2	Modelos propostos da imunopatologia da sepse.....	15
Figura 1.3	Reprogramação do metabolismo energético em macrófagos.....	19
Figura 3.1	Metodologia para o janelamento de monócitos.....	28
Figura 3.2	fluxo de trabalho do experimento de proteômica <i>shotgun</i>	30
Figura 3.3.	Nanocromatografia líquida seguida de ionização por eletrospray	32
Figura 3.4	Espectrômetro de massas Q Exactive Plus.....	33
Figura 3.5	Aquisição dependente de dados.....	34
Figura 3.6	Esquema do processo de identificação de peptídeos.....	35
Figura 3.7	Proteômica baseada no monitoramento de reação selecionada.....	38
Figura 3.8	Fluxo de trabalho do experimento de proteômica dirigida.....	39
Figura 4.1	Efeito da antimicina A sobre o ATP celular em macrófagos murinos.....	41
Figura 4.2	Glicólise em células ativadas pelo LPS.....	42
Figura 4.3	Expressão de HLA-DR em pacientes com sepse e controles.....	43
Figura 4.4	Perfil das amostras em SDS-PAGE.....	46
Figura 4.5	Diagrama de Venn das proteínas inferidas nos grupos.....	49
Figura 4.6	Abundância diferencial das proteínas entre os grupos.....	50
Figura 4.7	Mudanças do proteoma nos grupos experimentais.....	51
Figura 4.8	Vias super-representadas dentre as proteínas diferencialmente abundantes.....	53
Figura 4.9	Análise topológica da rede de interações das proteínas.....	56
Figura 4.10	Perfil imunometabólico dos grupos experimentais.....	57
Figura 4.11	Monitoramento dos peptídeos no ensaio de SRM.....	60
Figura 4.12	Variabilidade técnica nas aquisições.....	61
Figura 5.1	Número anual de publicações pelo termo de busca <i>immunometabolism</i>	63
Figura 5.2	Quantidade de ATP celular em monócitos tratados com antimicina A.....	65
Figura 5.3	Concentrações seriadas de glicose e lactato.....	66
Figura 5.5	Resumo dos principais achados relativos ao fenótipo Imunometabólico.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)	2
Tabela 1.2	Escore SOFA	3
Tabela 1.3	Correspondência entre as classificações de sepse	6
Tabela 1.4	Mortalidade hospitalar em diferentes estudos epidemiológicos que incluíram dados do Brasil	7
Tabela 1.5	Pacote de tratamento da Sepse, de acordo com as recomendações da CSS	10
Tabela 1.6	Estudos de proteômica na sepse clínica	23
Tabela 4.1	Características demográficas, gravidade da doença e desfechos dos pacientes sépticos e controles	45
Tabela 4.2	Parâmetros derivados da preparação das amostras	46
Tabela 4.3	Número absoluto de peptídeos identificados e proteínas inferidas nos grupos experimentais	49
Tabela S1	Todas as proteínas identificadas com confiança nos grupos, pelo critério da máxima parcimônia	*
Tabela S2	Lista de proteínas diferencialmente expressas nas comparações entre os grupos	*
Tabela S3	Lista inicial de proteínas e método final do experimento de SRM	*

* Disponibilizado para a banca através de um suplemento eletrônico

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-NBDG: *2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose*
- 2DGE: eletroforese bidimensional em gel
- AA: antimicina A
- ACN: acetonitrila
- AGC: *automatic gain control*
- ALR: *AIM2-like receptor*
- ATP: adenosina trifosfato
- BSA: albumina do soro bovino
- CARS: síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (compensatory anti-inflammatory response syndrome)
- CD: grupo de diferenciação
- CID: dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation*)
- CLP: ligadura e punção cecal (*cecal ligation and puncture*)
- CLR: receptor de lectina de tipo C (*C-type lectin receptor*)
- CSS: Campanha de Sobrevivência à Sepse
- CV: coeficiente de variação
- DAMP: padrão molecular associado ao dano (damage-associated molecular patterns)
- DDA: aquisição dependente de dados (*data-dependent acquisition*)
- DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPIC: *Extended Prevalence of Infection in Intensive Care*
- eQTL: *expression quantitative trait loci*
- ERK: quinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinases*)
- ESI: *electrospray ionization*
- EUA: Estados Unidos da América
- FA: ácido fórmico
- FDR: taxa de falsas descobertas (*false discovery rate*)
- FiO₂: fração inspirada de oxigênio
- FR: frequência respiratória
- FWHM: *full width half maximum*
- GLUT: transportador de glicose (*glucose transporter*)
- GRADE: *Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*

GWAS: estudo de associação genômica ampla (*genome-wide association study*)

HCD: *Higher-energy collisional dissociation*

HIF: fator induzido pela hipóxia (*hypoxia-inducible factor*)

HLA: antígeno leucocitário humano (*human leucocyte antigen*)

HMGB-1: *high mobility group box 1*

IFN: interferon

IL: interleucina

JNK: cJun NH2-terminal quinase

LC: cromatografia líquida (*liquid chromatography*)

LDH: lactato desidrogenase

LPS: lipopolissacarídeo

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*)

MCC: centralidade do clique máximo (*Maximum Clique Centrality*)

MDP: grau de perturbação molecular (*molecular degree of perturbation*)

MDSC: células supressoras de origem mielóide (*myeloid-derived suppressor cells*)

MFI: mediana da intensidade de fluorescência

MHC: complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)

MS: espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin*)

NF-κB: fator nuclear κB (*nuclear factor κB*)

nLC-nESI: Nanocromatografia líquida seguida de ionização por *electrospray*

NRL: *nucleotide-binding domain receptors*

PaCO₂: pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial

PAM: pressão arterial média.

PAMP: padrão molecular associado a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern*)

PaO₂: pressão parcial do oxigênio no sangue arterial

PBMC: células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cell*)

PBS: salina tamponada fofatada (*phosphate-buffered saline*)

PD-1: programmed cell death protein 1

PDH: prolil-hidroxilase

PE: Ficoeritrina

PeCP-Cy5.5: *peridinin-chlorophyll-protein – cyanine 5.5*

PI3K: fostatidil-inositol-3-kinase

PKM2: isoenzima M2 da piruvato kinase

PRR: receptor de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptor*)

PSICQUIC: *Proteomics Standard Initiative Common QUery InterfaCe*

PSM: *Peptide Spectrum Match*

qSOFA: avaliação sequencial de falência de órgãos rápida (*quick sequential organ failure assessment*)

RLR: *RIG-I-like receptor*

RNA-Seq: sequenciamento de RNA (*RNA sequencing*)

ROS: espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

SAPS: *Simplified Acute Physiological Score*

SC: contagem de espectros (*spectral counting*)

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio

SIDA: síndrome da imunodeficiência adquirida

SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica (*systemic inflammatory response syndrome*)

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms*)

SOFA: avaliação sequencial de falência de órgãos (*sequential organ failure assessment*)

SPREAD: Sepsis Prevalence Assessment Database

SRM: monitoramento de reação selecionada (*selected reaction monitoring*)

STAT: ativador de transcrição de sinal e transdutor de ativação- (*signal transducers and activators of transcription*)

SWATH: *sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra*

TFA: ácido trifluoroacético

TLR: receptor do tipo Toll (*Toll like receptor*)

TNF: fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor)

UTI: unidade de terapia intensiva

RESUMO

A sepse representa um desafio para os sistemas de saúde em todo o mundo, pela sua elevada incidência, mortalidade e custos associados. O evento fundamental para o desenvolvimento da sepse parece ser a desregulação e perda do direcionamento da resposta inflamatória, podendo resultar em estados hiperinflamatórios ou de imunossupressão, com reflexos patológicos sistêmicos. No entanto, o mecanismo através do qual esta disfunção imunológica se estabelece ainda permanece em grande parte obscuro, e nenhum agente imunomodulatório se encontra disponível para o tratamento clínico da sepse. As células da linhagem monocítica fagocitária são agentes essenciais na resposta inicial à infecção. Um conjunto crescente de evidências aponta para uma relação de interdependência entre o metabolismo e o estado de ativação imune dessas células. Ao mesmo tempo, estudos prévios sugerem que uma disfunção bioenergética de leucócitos na sepse poderia prejudicar a formação de uma resposta imune efetiva, associando-se a desfechos clínicos desfavoráveis. Nos estudos que compõem esta tese, procuramos caracterizar o fenótipo imunometabólico de monócitos na sepse. Demonstramos em experimentos *in vitro* que macrófagos e monócitos ativados apresentam um intenso aumento da atividade glicolítica, que passa a ser a principal fonte geradora de ATP celular, acompanhado de uma redução da fosforilação oxidativa. Em seguida, estabelecemos uma coorte prospectiva para caracterizar o proteoma dos monócitos do sangue periférico, comparando quantitativamente amostras de doadores saudáveis às de pacientes na fase aguda da sepse e na fase de recuperação. Utilizando uma abordagem de proteômica exploratória, nossos dados evidenciaram que, de forma semelhante ao observado nos modelos experimentais, a transição para a glicólise é uma característica proeminente na fase aguda da sepse. Além disso, o perfil da coorte foi inicialmente sugestivo de imunossupressão, sendo sucedido na fase de recuperação pela restauração da imunocompetência, o que foi documentado pela regulação diferencial de proteínas envolvidas na apresentação de antígenos, como o HLA-DR, e sinalização por citocinas, particularmente o IFN- γ . Avaliamos também a aplicabilidade de uma metodologia de proteômica dirigida para a verificação e aprofundamento da investigação das alterações observadas. Nosso estudo sugere que as vias do metabolismo energético podem ter um papel relevante na imunopatogênese da sepse.

ABSTRACT

Sepsis represents a challenge for healthcare systems around the world due to its high incidence, mortality, and associated costs. The fundamental event for the development of sepsis seems to be the deregulation and loss of directionality of the inflammatory response, which may result in hyperinflammatory or immunosuppressive states, with systemic pathological reflexes. However, the mechanism by which this immunological dysfunction is established remains largely obscure, and no immunomodulatory agent is available for the clinical treatment of sepsis. Mononuclear phagocyte system cell lines are essential agents in the initial response to infection. A growing body of evidence points to a relationship of interdependence between the metabolism and the immune activation state of these cells. At the same time, previous studies have suggested that a bioenergetic dysfunction of leukocytes in sepsis could impair the formation of an effective immune response, associated with unfavorable clinical outcomes. In the studies that compose this thesis, we sought to characterize the immunometabolic phenotype of monocytes in sepsis. We demonstrated using *in vitro* experiments that activated macrophages and monocytes present an intense increase of glycolytic activity, which becomes the main source of cellular ATP, accompanied by a reduction of oxidative phosphorylation. Next, we established a prospective cohort to characterize the proteome of peripheral blood monocytes, comparing quantitatively healthy donor samples to those of patients in the acute phase of sepsis and in the recovery phase. Using an exploratory proteomics approach, our data showed that, similar to that observed in the experimental models, the shift to glycolysis is a prominent feature in the acute phase of sepsis. In addition, the cohort profile was initially suggestive of immunosuppression, being succeeded by the restoration of immunocompetence in the recovery phase, which was documented by the differential regulation of proteins involved in the presentation of antigens, such as HLA-DR, and cytokine signaling, particularly IFN- γ . We also evaluated the applicability of a targeted proteomics methodology to verify and deepen the investigation of the observed changes. Our study suggests that energetic metabolic pathways may play a relevant role in the immunopathogenesis of sepsis.

1. Introdução

1.1 O conceito e definições de sepse

A degeneração das funções vitais que se segue à infecção é um fenômeno descrito ao longo da História, incorporado aos modelos de saúde e doença de diferentes povos e épocas.

A palavra "sepse" é originária do grego, significando o processo de decomposição da matéria orgânica. Na literatura médica, o termo é inicialmente encontrado na coleção hipocrática, empregado dentro do contexto da "discrasia", ou desequilíbrio da constituição natural dos humores corporais (1).

O conceito atual de sepse começou a tomar forma no século XIX, a partir do estabelecimento da Teoria dos Germes e da descrição da imunidade celular e humoral, continuando a evoluir através do século XX até o presente. Em 1914, Hugo Schottmüller propôs que o desenvolvimento da sepse seria dependente da invasão da corrente sanguínea por bactérias provenientes de um foco infeccioso (2). Paralelamente, o conceito da manutenção da estabilidade do ambiente interno como o princípio fisiológico fundamental foi elaborado por Claude Bernard e, posteriormente, por Walter Bradford Cannon, que criou o termo "homeostase", reforçando a noção de que estados patológicos podem decorrer de perturbações que excedem a capacidade de compensação pelos mecanismos homeostáticos do organismo (3). A partir de experimentos em ratos expostos a diversos estímulos nocivos, Hans Selye descreveu uma síndrome em estágios, que representaria um "esforço generalizado do organismo para adaptar-se à novas condições" (4).

Na segunda metade do século XX, essas ideias se consolidaram na clínica a partir da criação das unidades de terapia intensiva, que permitiram o estudo sistemático de doentes graves em um ambiente controlado. Na década de 1970, Tilney e colaboradores caracterizaram uma "falência sequencial de sistemas" baseando-se na investigação de uma série de casos de pacientes submetidos à cirurgia para reparação de aneurisma aórtico roto (5). Sobre essa síndrome, Baue observou, a partir da revisão de necrópsias de pacientes que morreram após um período prolongado de ressuscitação e suporte em unidades de terapia intensiva, que "...a mesma combinação de problemas é observada em diversos pacientes com diagnósticos primários muito diferentes" (6). Configurou-se, portanto, uma entidade clínica distinta, comum a pacientes expostos a elevados níveis de estresse fisiológico de etiologias diversas, incluindo a infecção. A percepção de que uma resposta pró-inflamatória

exacerbada seria o elemento central da resposta patológica do hospedeiro na sepse também tornou-se proeminente nessa época, estimulada pela descoberta do fator de necrose tumoral (TNF) e da interleucina-1 (IL-1), cuja administração exógena foi capaz de reproduzir os sintomas característicos da endotoxemia em modelos animais (7).

É nesse contexto que Bone e colaboradores decreveram uma “síndrome séptica”, composta por taquicardia, taquipnéia, hiper ou hipotermia e disfunção de órgãos secundária à hipoperfusão, o que seria, segundo os autores, o reflexo de uma “resposta sistêmica a uma infecção” e representaria, “critérios clínicos não invasivos, prontamente disponíveis em um estágio da deterioração mais precoce do que descrições prévias na literatura” (8). Essa síndrome foi tomada como o fundamento de uma conferência de consenso de sociedades de terapia intensiva organizada em 1991 com o objetivo de estabelecer uma estrutura prática e conceitual para o diagnóstico, monitoramento e pesquisa da sepse (9). Como resultado da conferência, foi criada a “síndrome da resposta inflamatória sistêmica” (SIRS), que incorporou as variáveis da síndrome séptica, tendo como causas potenciais as infecções, mas também injúrias inflamatórias não-infecciosas como o trauma, pancreatite e queimaduras (Tabela 1.1). O termo “sepse” passa a descrever a SIRS provocada por uma infecção, que pode ser classificada adicionalmente como “sepse grave” ou “choque séptico” quando acompanhada por disfunções orgânicas, hipoperfusão, hipotensão e choque circulatório.

Tabela 1.1: Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)

Dois ou mais dos critérios:

- Febre (temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$), ou hipotermia (temperatura corporal $< 36^{\circ}\text{C}$).
- Taquipnéia (FR > 20 ipm), ou hiperventilação ($\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg).
- Taquicardia (Frequência cardíaca > 90 bpm).
- Leucocitose (Leucometria total > 12000 cu/mm), ou leucopenia (Leucometria total < 4000 cu/mm), ou presença de neutrófilos imaturos (“bastões”) $>10\%$ do total.

FR: frequência respiratória; PaCO_2 : pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial

A conferência de 1991 resultou no primeiro conjunto de definições relacionadas à sepse amplamente difundidos e adotados mundialmente. Com isso, permitiu o intercâmbio de dados epidemiológicos e a confecção de protocolos de pesquisa clínica em torno de um vocabulário comum. No entanto, limitações práticas, relacionadas principalmente aos

critérios diagnósticos propostos para a SIRS tornaram-se evidentes ao longo dos anos. Apesar de haver evidências de que a história natural da sepse evolui de acordo com o espectro de gravidade proposto pelas classificações do consenso, diversos estudos apontaram para uma alta prevalência da SIRS nas populações de pacientes de UTIs, independentemente do diagnóstico primário, conferindo um baixo poder discriminatório para essa síndrome (10,11).

A necessidade de critérios mais acurados para o diagnóstico clínico da sepse tornou-se, portanto, o ponto central de discussão na segunda conferência de consenso para definições de sepse, em 2001 (12). O grupo de especialistas reconheceu a limitada aplicabilidade dos critérios de sepse então vigentes na prática clínica e seguiu com a proposta de ampliar as variáveis empregadas no diagnóstico da sepse para que refletissem o processo através do qual “um clínico experiente conclui que um paciente infectado ‘parece séptico’”. Sugeriram também que a estratificação dos pacientes de acordo com características de base (ex. comorbidades, idade), da infecção (ex. agente etiológico, sítio anatômico), e da resposta inflamatória e disfunções orgânicas (sinais clínicos, biomarcadores), poderia melhorar a predição do prognóstico e resposta terapêutica. O debate dessas questões não resultou, entretanto, em uma nova definição operacional para a sepse, o que seria, segundo os autores, um reflexo da ausência de evidências científicas suficientes para orientar uma revisão dos critérios de 1991.

A resposta a esse desafio só foi elaborada por uma força-tarefa internacional organizada em 2016 (13). Primeiramente, o painel de especialistas propôs o abandono da SIRS, em favor do surgimento de disfunções orgânicas potencialmente letais, como a característica clínica fundamental para a distinção entre a infecção não complicada e a sepse. Em seguida, empregando uma abordagem baseada em evidências, analisaram grandes bancos de dados de pacientes hospitalizados por infecção, buscando as variáveis clínicas que melhor se correlacionaram com a evolução para a sepse, servindo como suporte para o estabelecimento de novos critérios diagnósticos. Como resultado, o escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*) foi eleito como a ferramenta para o diagnóstico das disfunções orgânicas relacionadas à sepse, pela sua boa performance como preditor de prognóstico e por ser um instrumento relativamente simples e já previamente validado e conhecido nas unidades de terapia intensiva (Tabela 1.2). Os critérios para a definição do choque séptico também foram reformulados, passando a contemplar a existência

concomitante de hipotensão, com necessidade do uso de vasopressores, e hiperlactatemia (Tabela 1.3). Além disso, foi criado um novo escore, denominado qSOFA, para a triagem de pacientes potencialmente sépticos utilizando variáveis facilmente acessíveis ao examinador na beira do leito.

Tabela 1.2: Escore SOFA

Sistema	Pontuação			
	1	2	3	4
Respiração (PaO ₂ /FiO ₂)	< 400	< 300	< 200 (e suporte ventilatório)	< 100 (e suporte ventilatório)
Coagulação (plaquetas x 10 ³ /mm ³)	< 150	< 100	< 50	< 20
Fígado (bilirrubina - mg/dL)	1,2– 1,9	2,0 - 5,9	6,0 - 11,9	> 12,0
Cardiovascular (hipotensão arterial)*	PAM < 70 mmHg	Dopamina ≤ 5, ou dobutamina (qualquer dose)	Dopamina > 5, ou adrenalina ≤ 0,1, ou noradrenalina ≤ 0,1	Dopamina > 15, ou adrenalina > 0,1, ou noradrenalina > 0,1
Sistema nervoso central (Escala de Coma de Glasgow)	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Renal (creatinina - mg/dL) ou débito urinário - mL/dia	1,2 – 1,9	2,0 - 3,4	3,5 - 4,9, ou < 500mL/dia	> 5,0, ou < 200mL/dia

PaO₂: pressão parcial do oxigênio no sangue arterial; FiO₂: fração inspirada de oxigênio, PAM: pressão arterial média.

Tabela 1.3. Correspondência entre as classificações de sepse

Classificação prévia	Classificação da força-tarefa de 2016
Sepse: Infecção, com ≥ 2 critérios de SIRS	Infecção
Sepse grave: Sepse com disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão	Sepse: Infecção com disfunção orgânica definida por mudança de ≥ 2 pontos no escore SOFA
Choque séptico: Sepse com hipotensão não responsiva à expansão volêmica	Choque séptico: Sepse com hipotensão e hiperlactatemia não responsivas à expansão volêmica

A revisão proposta pela força-tarefa provocou uma polêmica considerável na comunidade médica, e não foi integralmente endossada por importantes sociedades como o *American College of Chest Physicians*, *American College of Emergency Physicians* e Instituto Latino Americano de Sepse. As críticas se concentraram principalmente em aspectos metodológicos, relativos à análise das bases de dados utilizada para a validação das novas definições, com a qualidade dos critérios empregados para definir casos de infecção, a localização geográfica restrita e a análise exclusivamente retrospectiva sendo apontados como fatores limitantes (14,15). Também ressaltou-se que a redução da sensibilidade dos critérios de sepse pode restringir a capacidade de detecção precoce dos casos, e vai de encontro ao interesse das ações de saúde de países em desenvolvimento, onde o objetivo é ampliar a percepção do problema (16).

Apesar do objetivo eminentemente clínico, o documento da força-tarefa de 2016 também representa um marco conceitual, à medida que incorpora e consolida a evolução do entendimento da fisiopatologia da sepse ao longo dos 25 anos que sucederam a conferência de 1991. A natureza da resposta desregulada do hospedeiro que resulta na sepse se mostrou muito mais complexa e heterogênea do que inicialmente se supôs. O desequilíbrio entre a ativação de vias pró e anti-inflamatórias pode resultar frequentemente em um estado de imunossupressão nos pacientes sépticos (17). A isso, soma-se a constatação de que algum grau de reação sistêmica clinicamente detectável acompanha também os casos de infecção não complicada, suscitando o argumento dos autores de que a SIRS seria uma concepção muito genérica e imprecisa para ser tomada como base para a descrição da fisiopatologia da sepse (18). A obtenção de dados por técnicas de larga escala, como a genômica, transcriptômica e proteômica, nos forneceu uma janela para a diversidade das relações entre os elementos dos sistemas biológicos que podem resultar em estados patológicos, permitindo a aplicação empírica de conceitos, até então relativamente inacessíveis, da teoria geral de sistemas, cibernética e teoria do caos (19). Talvez o efeito mais importante do conhecimento acumulado seja o amadurecimento da percepção dos limites e incertezas atuais, resumidos pelos autores: “A sepse não é uma doença específica, mas uma síndrome que envolve uma patobiologia ainda indefinida”(13).

1.2 O problema clínico da sepse

Considerações epidemiológicas

A sepse representa um desafio para os sistemas de saúde em todo o mundo, pela sua elevada incidência, mortalidade e custos associados. Reconhecendo a sepse como uma prioridade global, a Organização Mundial da Saúde publicou uma resolução no ano de 2017 convocando os países membros a tomarem medidas urgentes para melhorar a sua prevenção, diagnóstico e assistência (20).

É difícil obter estimativas precisas relativas à epidemiologia da sepse em escala mundial. Uma meta-análise recente sugeriu que ocorrem anualmente cerca de 31.5 milhões de casos no mundo, ocasionando 5.3 milhões de mortes (21). No entanto, esse cálculo foi prejudicado pela falta de dados provenientes de países em desenvolvimento, tendo que ser extrapolado a partir de estudos realizados em países desenvolvidos. Essa é uma limitação importante, já que países de baixa e média renda comportam a maior parte da população global e apresentam características da distribuição de doenças e acesso à assistência de saúde que diferem substancialmente daquelas dos países de alta renda (22).

Estatísticas nacionais dos Estados Unidos da América (EUA) obtidas a partir de grandes bancos de dados administrativos de hospitais, apontam para uma incidência de sepse grave que pode variar entre 300 a 1031 por 100.000 habitantes ao ano, com mortalidade entre 14.7 e 29.9%, contribuindo para 1 a cada 2 a 3 óbitos hospitalares (23). Os países da Europa, apesar de heterogêneos, apresentam números semelhantes (24).

No Brasil, as informações epidemiológicas disponíveis sugerem uma mortalidade ainda maior. Cinco estudos multicêntricos prospectivos que incluíram dados do país foram conduzidos nas últimas duas décadas (Tabela 1.4)(25–29). O mais recente e abrangente foi o estudo *Sepsis Prevalence Assessment Database* (SPREAD), que realizou o acompanhamento pacientes identificados em um único dia em 227 UTIs. A prevalência de sepse grave foi de 36,7% (794 de 2632 pacientes), com uma taxa de mortalidade hospitalar de 56%. O desenho experimental, que incluiu a amostragem aleatória de UTIs previamente estratificadas pela região geográfica e características dos hospitais, permitiu pela primeira vez a obtenção de uma estimativa nacional de 419.047 casos de sepse em adultos tratados em UTIs ao ano, provocando 233.409 mortes.

Tabela 1.4: Mortalidade hospitalar em diferentes estudos epidemiológicos que incluíram dados do Brasil.

Autor	Número de pacientes	Mortalidade	Abrangência
Silva e cols., 2004 (27)	241	Sepse: 33,9 % Sepse grave: 46,9% Choque séptico: 52,2%	5 hospitais de São Paulo e Santa Catarina
Sales Júnior e cols., 2006 (25)	521	Sepse: 16,7 % Sepse grave: 34,4% Choque séptico: 65.3%	65 hospitais distribuídos por todas as regiões do país
Sogayar e cols., 2008 (26)	524	Mortalidade global (sepse, sepse grave e choque séptico):43,9%	21 em hospitais das regiões sul, sudeste e nordeste
Beale e cols., 2009 (28)	931	Sepse grave: 67,4%	Amostra brasileira de um total de 12.881 casos de sepse grave em 37 países
Machado e cols., 2017 (29)	794	Mortalidade global (sepse grave e choque séptico): 56%	227 UTIs distribuídas por todas as regiões do país

O impacto da sepse sobre a saúde não se limita ao período da internação hospitalar. Estudos que acompanharam pacientes que sobreviveram à sepse, revelaram um declínio persistente na capacidade física e cognitiva, que pode estar associado a um aumento da mortalidade no longo prazo (30,31).

A ocorrência e evolução clínica da sepse são influenciadas por características do hospedeiro e do agente infeccioso. Dos fatores demográficos, o mais importante é a idade, observando-se uma distribuição bimodal, com aumento da incidência em crianças menores de 1 ano e idosos (32). Em um grande estudo observacional de adultos com sepse ao longo de 24 anos nos EUA, os pacientes com idade maior ou igual a 65 anos representaram 64.5% dos casos, com risco de morte 1.56 vezes maior do que o restante da população da coorte (33). Comorbidades como diabetes, DPOC, câncer e SIDA podem predispor ao surgimento da sepse e prejudicar a capacidade de recuperação do organismo (34). Mesmo em indivíduos previamente saudáveis, características genéticas podem levar a uma

variabilidade na resposta inflamatória a patógenos, com diferentes reflexos nos desfechos clínicos (35).

Com relação aos agentes etiológicos, a sepse é mais frequentemente associada a infecções bacterianas, apesar de poder ser provocada por qualquer tipo de microorganismo patogênico. Portanto, há potencialmente uma ampla gama de fatores relacionados, por exemplo, à virulência ou resistência a antimicrobianos que poderiam afetar o curso da sepse. Em aproximadamente 30 a 50% dos casos as culturas são negativas, o que pode ser decorrente de limitações técnicas dos ensaios laboratoriais ou da administração de antibióticos antes da obtenção dos espécimes clínicos (36). No estudo *Extended Prevalence of Infection in Intensive Care* (EPIC II), que avaliou casos de sepse em adultos de 75 países (incluindo o Brasil), 62% dos patógenos identificados foram bactérias gram-negativas, 47% bactérias gram-positivas e 19% fungos. O sítio anatômico mais acometido foram os pulmões (64% dos casos), seguido pelas infecções abdominais (20%), da corrente sanguínea (15%) e do trato genitourinário (14%) (37). Além de frequentes, há evidências de que as infecções causadas por *Pseudomonas sp.*, bem como as de foco abdominal, estão associadas a uma maior mortalidade hospitalar (24,37). Os casos de sepse por outros agentes como os vírus influenza, arboviroses e malária se tornam mais proeminentes dentro do contexto sazonal ou geográfico, e os vírus respiratórios podem estar sendo subdiagnosticados como agentes primários ou coinfectantes nas UTIs (38).

O estado atual do tratamento

A sepse é uma emergência médica e, portanto, o manejo bem-sucedido dos pacientes depende da detecção e intervenções terapêuticas precoces. Em uma dimensão mais ampla, isso representa uma questão que deve ser abordada em conjunto pelos órgãos de saúde pública e sociedades médicas. A resposta mais consistente a essa demanda foi a Campanha de Sobrevivência à Sepse (CSS), uma iniciativa internacional de sociedades de terapia intensiva, coordenada no Brasil pelo Instituto Latino-americano de Sepse, que tem como objetivo educar o público geral e os profissionais de saúde. Para o clínico, o aspecto mais relevante da campanha são as diretrizes assistenciais, inicialmente publicadas no ano de 2002 e atualmente em sua terceira revisão, que se tornaram o padrão mundial para o tratamento da sepse (39).

A partir do diagnóstico, as condutas imediatas visam a estabilização clínica e o controle da infecção. Essas intervenções são prioritárias, pois são as que tem

potencialmente o maior impacto sobre o prognóstico e, por outro lado, sua eficácia é negativamente afetada por atrasos na implementação.

A antibioticoterapia empírica de amplo espectro deve ser iniciada o mais rápido possível, após a obtenção de culturas. Uma análise retrospectiva de uma grande base de dados da CSS demonstrou um aumento linear da probabilidade de mortalidade hospitalar a cada hora em que início de antibióticos é adiado, com uma variação de aproximadamente 10% após 6 horas (40).

A hipoperfusão tecidual induzida pela sepse é um dos principais fatores que desencadeiam as disfunções orgânicas. A ressuscitação hemodinâmica precoce, baseada na administração de fluidos para restaurar o volume intravascular e, nos pacientes com resposta inicial insatisfatória, fármacos vasopressores, foi capaz de reduzir significativamente a mortalidade de pacientes com sepse em um ensaio clínico randomizado (41). Apesar das variáveis fisiológicas específicas tomadas como alvos para a ressuscitação nesse estudo terem sido questionadas subsequentemente, os seus fundamentos permanecem como um guia para a prática atual (42). Em contraste, um protocolo semelhante de otimização hemodinâmica não demonstrou nenhum efeito sobre os desfechos clínicos em um momento mais tardio da internação (43).

As principais condutas recomendadas pelas diretrizes da CSS tipicamente são apresentadas em um pacote de tratamento, com o objetivo de simplificar e organizar o processo da assistência, estabelecendo prioridades e metas a serem atingidas pelas equipes responsáveis pelo cuidado dos pacientes (Tabela 1.5) (44).

Tabela 1.5: Pacote de tratamento da Sepse, de acordo com as recomendações da CSS

Elemento do pacote	Força da recomendação e qualidade de evidência*
Meça o lactato sérico. Meça novamente (em 2-4 horas) se o valor inicial for ≥ 2 mmol/L	Recomendação fraca, baixa qualidade de evidência
Obtenha hemoculturas antes da administração de antibióticos	Declaração de melhores práticas
Administre antibióticos de amplo espectro	Recomendação forte, moderada qualidade de evidência
Administre rapidamente 30 ml/kg de cristalóide para hipotensão ou lactato ≥ 4 mmol/L	Recomendação forte, baixa qualidade de evidência
Administre vasopressores se o paciente estiver hipotenso durante ou após a ressuscitação volêmica inicial para manter uma PAM ≥ 65 mm Hg	Recomendação forte, moderada qualidade de evidência

* De acordo com o sistema GRADE (45). PAM: Pressão arterial média

A difusão dessas estratégias e os avanços qualitativos das unidades terapia intensiva são apontados como os principais fatores para a redução da mortalidade associada à sepse que vem sendo documentada nos últimos anos (46,47).

No entanto, examinando-se as terapias empregadas na prática clínica atual, é notável a ausência de fármacos dirigidos especificamente para a modulação da resposta imune, que é o elemento central da fisiopatologia da sepse. Uma revisão recente contabilizou mais de 100 estudos clínicos de fases II e III realizados nas últimas cinco décadas com esse objetivo (48). Os primeiros agentes estudados foram os corticóides, administrados em doses imunossupressoras, e anticorpos neutralizadores da endotoxina (49,50). Em seguida, à medida que a compreensão dos mecanismos da resposta inflamatória avançou ao longo dos anos, propuseram-se diversas terapias que visam principalmente suprimir a cascata de sinalização por citocinas, incluindo inibidores de mediadores específicos como o TNF e IL-1, e antagonistas de receptores como o Toll 4 (TLR4) (51). De todos os potenciais tratamentos avaliados, somente um, a proteína C ativada, chegou a ser aprovado para o uso clínico, mas foi posteriormente retirado do mercado após um estudo confirmatório não ter demonstrado um efeito benéfico (52,53).

Os motivos dessa incapacidade de se produzir medicamentos clinicamente efetivos a partir de alvos farmacológicos hipotéticos vêm sendo debatidos por diversos autores e não

são inteiramente compreendidos, mas parece haver um consenso a respeito da importância de alguns temas (48,54,55):

- Historicamente, muitos estudos clínicos foram propostos diretamente a partir de resultados de eficácia em modelos animais, que apresentam uma série de limitações. Os experimentos pré-clínicos de sepse tipicamente utilizam animais jovens e saudáveis, nos quais a aplicação de um estímulo agudo, que pode variar da administração de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o LPS, à infecção por microorganismos viáveis, como na ligadura e punção cecal (CLP), resulta em uma rápida e intensa ativação de uma resposta pró-inflamatória (56). A maior parte dos pacientes, por sua vez, é idosa, possui comorbidades e desenvolve a sepse com um curso inicialmente subagudo (57,58). Apesar dessas discrepâncias entre os modelos animais e a sepse clínica serem transponíveis pelo desenvolvimento de protocolos experimentais mais complexos, outras diferenças importantes provavelmente ainda permanecerão. A sepse, por definição, envolve o surgimento de disfunções orgânicas graves, o que no ambiente clínico resulta invariavelmente no emprego de modalidades sofisticadas e custosas de suporte vital, como ventilação mecânica e hemodiálise, com ajustes das condutas baseadas em monitoramento contínuo, por vezes ao longo de semanas. Esse nível de cuidados é muito difícil de ser reproduzido em modelos experimentais, e contribui para um estado de perturbação fisiológica particular na sepse clínica, o que se reflete inclusive em curvas de sobrevivência marcadamente distintas entre as duas condições (Figura 1.1). Além disso, as respostas genômicas a estímulos inflamatórios também podem variar significativamente entre as espécies. Em um estudo que realizou a análise transcriptômica de leucócitos do sangue no trauma, queimaduras e endotoxemia, houve uma correlação muito baixa da expressão gênica entre humanos e murinos (59).

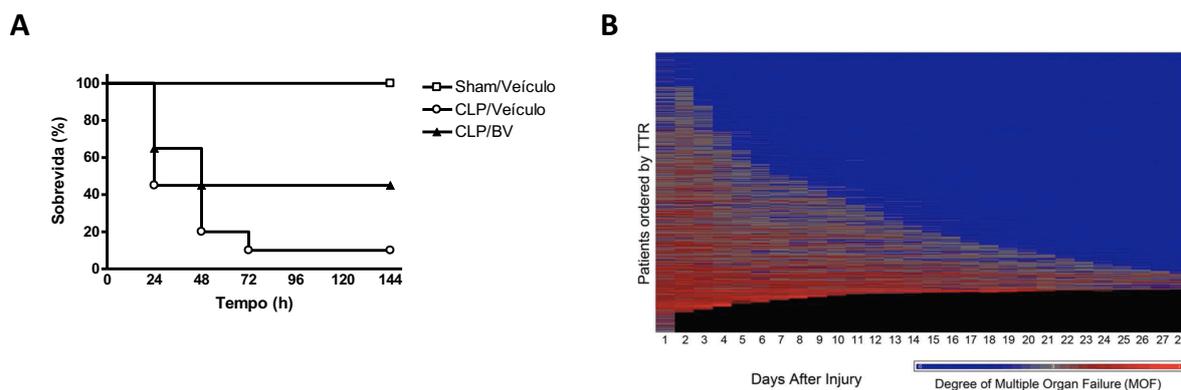


Figura 1.1: Curvas de sobrevida representativas da sepse experimental em murinos (A) e na clínica (B). Em (A), o eixo y representa a sobrevida percentual de grupos de animais sépticos (CLP), submetidos ou não a um tratamento experimental (BV) e controles sem sepse (Sham), ao longo de horas (eixo x). Em (B), as linhas representam pacientes individuais, ordenados de cima para baixo do menor (azul) ao maior (vermelho) grau de disfunções orgânicas e mortalidade (preto), ao longo de dias (eixo x). CLP: ligadura e punção cecal; TTR: tempo até a recuperação. A figura B foi reproduzida de (60).

- O uso das definições clínicas de sepse como critério único de inclusão em estudos de intervenção pode levar à seleção de populações muito heterogêneas. A diversidade das características de base dos pacientes e da infecção poderiam resultar em variações na resposta patológica da sepse. Com isso, o efeito benéfico de uma terapia em um subgrupo de indivíduos seria ocultado pelo efeito ausente, ou até mesmo oposto, em outros indivíduos do mesmo estudo. A procura de biomarcadores capazes de estratificar com mais precisão os pacientes é, conseqüentemente, um dos principais focos de pesquisa da sepse. Nesse contexto, moléculas individuais como citocinas ou receptores celulares já foram associadas à predição de desfechos clínicos ou estados de ativação imune, com reprodutibilidade variável (61). Nos últimos anos, a configuração de perfis moleculares através do uso de tecnologias ômicas vem se tornando mais comum e tem o potencial de capturar a natureza complexa e dinâmica da resposta do hospedeiro de forma mais efetiva e personalizada (62). Curiosamente, a categorização resultante desses estudos nem sempre confirma as características clínicas que presumivelmente seriam fontes de heterogeneidade. Por exemplo, em uma análise recente da resposta transcricional de leucócitos do sangue, as assinaturas de expressão gênica que se correlacionaram com a probabilidade de

mortalidade precoce foram análogas entre pacientes com sítios de infecção abdominal e pulmonar (63).

Tendo em vista essas questões ainda não resolvidas, parece ser imprescindível o estudo direto e aprofundado do material clínico, como uma etapa para a confirmação de efeitos observados em modelos animais ou para se explorar os mecanismos que são peculiares da sepse em humanos. Nesse sentido, os avanços na capacidade da obtenção e análise de informações abrangentes a partir de quantidades restritas de amostras biológicas podem ajudar a esclarecer as controvérsias e especulações a respeito da fisiopatologia da sepse, o que se faz necessário para fundamentar o investimento em alvos farmacológicos mais plausíveis e individualizados.

1.3. Fisiopatologia da sepse

A resposta inicial à infecção depende do reconhecimento dos patógenos pelas células efetoras da imunidade inata, como monócitos, macrófagos e neutrófilos, que atuam em conjunto com outros tipos celulares do tecido acometido. Esse reconhecimento se dá através dos PRRs (*pattern recognition receptors*), receptores capazes de identificar padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPS), estruturas altamente conservadas associadas a grupos de microorganismos (64). Os exemplos de PAMPS bem caracterizados são numerosos, e incluem moléculas presentes em bactérias (LPS), vírus (RNA de fita dupla), e fungos (β -glucana). Moléculas endógenas, denominadas *damage-associated molecular patterns* (DAMPS), cuja liberação está associada ao dano ou estresse celular, dentre as quais podemos citar a proteína *high mobility group box* (HMGB)-1, *heat shock proteins* e DNA mitocondrial, também são reconhecidas por esses receptores (65). Os PRRs são classificados em famílias, que podem estar associadas à membrana celular, como os receptores do tipo Toll (TLR) e *C-type lectin receptors* (CLRs) ou presentes de forma livre no citoplasma, como os *nucleotide-binding domain receptors*, (NLRs), *RIG-I-like receptors* (RLRs) e *AIM2-like receptors* (ALRs), sendo, portanto, capazes de detectar moléculas presentes no meio intra ou extracelular. Esses receptores atuam de forma integrada como uma rede sensorial que detecta a presença de microorganismos e cujo padrão de ativação combinada determina a natureza das respostas subsequentes. A ligação aos PRRs deflagra mecanismos específicos de sinalização celular, que induzem a expressão de genes mediada por fatores de transcrição como o *nuclear fator* (NF)- κ B, ou ainda a formação de inflamassomas, complexos proteicos que ativam a enzima

caspace-1. O resultado final desses mecanismos são respostas transcricionais relacionadas à inflamação, indução da fagocitose e regulação do processamento de citocinas, autofagia e morte celular, gerando novas demandas sobre o metabolismo celular (66). Esses fenômenos precoces são necessários para a coordenação da resposta imune, de forma a controlar localmente o foco infeccioso e orientar a resposta imune adaptativa adequada.

A restauração da homeostasia do tecido infectado é possível através de um delicado equilíbrio entre fatores pró e anti-inflamatórios. Um evento fundamental para o desenvolvimento da sepse parece ser a desregulação e perda do direcionamento da resposta inflamatória, com reflexos patológicos sistêmicos. A administração exógena de altas doses de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF e IL-1, é capaz de induzir rapidamente um estado de choque hemodinâmico, o que foi tomado como um dos principais mecanismos indutores da sepse nas primeiras construções teóricas da fisiopatologia, baseadas no conceito da hiperinflamação sistêmica (9,67,68). Apesar de haver situações clínicas específicas que presumivelmente correspondem a esse modelo, como a meningococemia, a maior parte dos pacientes apresenta um curso de evolução mais indolente, com as disfunções orgânicas se instalando de forma gradual, muitas vezes já no ambiente hospitalar, em uso de antibioticoterapia e de medidas de suporte vital (58).

Após a resposta inflamatória inicial, o estado de ativação imune que se sucede na sepse é ainda alvo de controvérsia, com modelos discordantes sendo apresentados na literatura. Na hipótese vigente mais tradicional, mecanismos desregulados de resolução da inflamação induzem em sequência um estado mais tardio de imunossupressão nos pacientes, a Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Compensatória (CARS) (69). Esse conceito parece ser corroborado pelos achados de um estudo de necropsia de pacientes que morreram por sepse, onde em 76% dos casos foi encontrado um foco infeccioso persistente (70). É também concordante com as observações da ocorrência de infecções oportunistas por bactérias de baixa virulência (como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Enterococcus sp.*), candidíase invasiva e reativação de infecções virais (71). Além disso, há evidências diretas da imunossupressão em pacientes com sepse. Por exemplo, em um estudo que avaliou amostras de biópsias de baço e pulmão coletadas imediatamente após o óbito na UTI, os esplenócitos apresentaram uma hiporresponsividade na produção de citocinas após o estímulo com o LPS, acompanhada de uma redução de moléculas co-estimuladoras e de apresentação de antígenos. Adicionalmente, observou-se

um aumento de populações celulares de caráter inibitório, como linfócitos T reguladores e células supressoras de origem mielóide (MDSC) (72).

Em contraste, um segundo modelo mais recente postula que progressão das disfunções orgânicas que levam à morte pela sepse seria o resultado de um estado de ativação inflamatória persistente, que é acompanhado pela supressão da imunidade adaptativa (Figura 1.2). Essa hipótese foi inicialmente proposta a partir da análise da transcriptômica de leucócitos do sangue de pacientes internados por trauma ou queimaduras, cuja evolução clínica e o padrão de expressão gênica são semelhantes aos observados em coortes de pacientes com sepse (60,73).

Os motivos para essas divergências entre os modelos são desconhecidos e podem estar relacionados às diferenças na capacidade da construção de significado biológico a partir de abordagens reducionistas baseadas em proteínas em oposição a técnicas de larga escala baseadas em RNA.

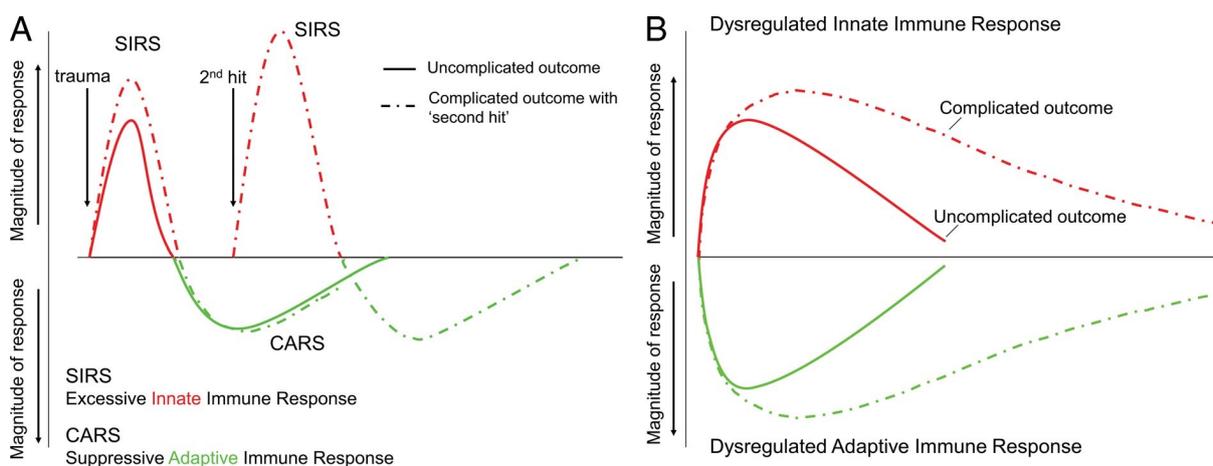


Figura 1.2: Modelos propostos da imunopatologia da sepse. Está representada a magnitude da resposta imune (eixo y) ao longo do tempo de evolução da sepse (eixo X). Em (A) o paradigma da SIRS/CARS, onde a resposta imune oscilaria entre a hiperinflamação e imunossupressão. O termo “2nd hit” denota um episódio de reinfeção, representando uma complicação da fase da CARS. Em (B) um modelo alternativo, onde os casos complicados cursariam com uma ativação inflamatória persistente. A figura foi reproduzida de (60)

Apesar da evidente desregulação do sistema imune na sepse, não há umnexo causal ou mecanismos claramente estabelecidos relacionando esse fenômeno ao surgimento das disfunções orgânicas. Existem indícios de que uma disfunção microcirculatória pode ocorrer nos órgãos acometidos (74). O endotélio ativado pela inflamação sistêmica expressa

moléculas de adesão, fator tecidual e substâncias vasoativas. Esse processo resulta na ativação e recrutamento de células inflamatórias, indução de um estado pró-coagulante e alterações no fluxo sanguíneo regional, o que tem o potencial de gerar lesão e quebra da barreira endotelial, formação de trombos e desvios no fluxo sanguíneo regional. Como resultado desses distúrbios microcirculatórios pode se instalar um déficit perfusional, com reflexos na função orgânica.

No entanto, o dano estrutural tissular que seria esperado como resultado da isquemia ou toxicidade inflamatória direta não é uma característica proeminente na sepse. Em estudos de necropsia, a morte celular é um achado infrequente e desproporcional ao grau das disfunções orgânicas observadas (75). Além disso, o consumo de oxigênio pode permanecer reduzido mesmo após a restauração da perfusão tecidual (76). Isso levou à hipótese de que um distúrbio bioenergético primário se estabelece em algum momento da evolução da sepse. As células entrariam em um estado de “hibernação”, utilizando os substratos energéticos para executar somente funções básicas relacionadas à sua sobrevivência, perdendo a atividade especializada e integração necessárias para o funcionamento fisiológico dos órgãos e sistemas vitais. Mecanismos específicos relacionados a um déficit da produção de ATP mitocondrial, como o desacoplamento da fosforilação oxidativa e inibição de complexos da cadeia transportadora de elétrons ou da ATP sintase foram propostos para explicar esse fenômeno (77).

Imunometabolismo

A relação entre o metabolismo e estados de ativação imune está ligada aos temas centrais da fisiopatologia da sepse. Assim como ocorre com outros tipos celulares, a disfunção bioenergética de leucócitos poderia prejudicar o estabelecimento de uma resposta imune adequada. Por outro lado, a transição do estado quiescente ao ativado, normalmente impõe um extenso redirecionamento de substratos celulares para atingir as novas demandas funcionais. Células T efetoras passam por um processo de expansão clonal, aumentando substancialmente suas populações. Os fagócitos precisam atuar nos tecidos infectados, que são ambientes onde a tensão de oxigênio encontra-se em níveis muito reduzidos como resultado das alterações perfusionais. Portanto, parece plausível que esses processos tenham evoluído de forma interdependente, e, de fato, nos últimos anos vem se tornando cada vez mais evidente que a sua regulação não é simplesmente um reflexo da

disponibilidade de oxigênio e nutrientes no ambiente tecidual, mas um processo altamente controlado por mecanismos específicos (78).

Os Monócitos e suas respostas imunometabólicas

Os monócitos, em conjunto com os macrófagos, células dendríticas e seus progenitores, constituem o sistema monocítico fagocitário, uma rede celular essencial para a coordenação da resposta à infecção e homeostasia tecidual. Após a sua formação na medula óssea, os monócitos são liberados na corrente sanguínea, onde constituem até 10% dos leucócitos. Na técnica de fracionamento do sangue por gradiente de densidade, se acumulam com os linfócitos na camada das células mononucleares do sangue periférico (PMBC). Em humanos, os monócitos circulantes são divididos em subpopulações, baseando-se na expressão de CD14 e CD16 na superfície celular (79). A população principal, denominada clássica, compreende 85% das células e tem expressão alta de CD14 e ausente de CD16. As populações minoritárias são a não-clássica, com expressão baixa de CD14 e alta de CD16 e a intermediária, que apresenta expressão relativamente alta dos dois marcadores.

Quando ativados, os monócitos são capazes de migrar rapidamente para os tecidos e se diferenciar em macrófagos e células dendríticas, atuando em conjunto com as células residentes. Esse papel tem sido associado principalmente aos monócitos clássicos, enquanto que à população não-clássica são atribuídas propriedades de patrulhamento e suporte do endotélio (80). Além disso, mais recentemente vem sendo demonstrado que os monócitos também atuam diretamente como efetores da imunidade inata, exibindo atividade microbicida por fagocitose, produção de NO, espécies reativas de oxigênio e citocinas, bem como apresentação de antígenos e direcionamento da resposta imune adaptativa (81,82).

Para entendermos o espectro potencial das respostas imunometabólicas dos monócitos, é útil examinarmos os fenótipos induzidos experimentalmente nas células do sistema monocítico fagocitário. Em macrófagos, é possível se obter *in vitro* uma polarização funcional através da incubação com LPS e interferon (IFN)- γ ou alternativamente IL-4, resultando em perfis de ativação pró-inflamatória (M1) ou anti-inflamatória e reparadora (M2), respectivamente (83).

Os macrófagos M1 sofrem uma intensa reprogramação do seu metabolismo energético em relação ao estado quiescente, com redução da fosforilação oxidativa e aumento da glicólise, que pode se tornar a ser a principal fonte de ATP celular, mesmo em

condições de normoxia (Figura 1.3) (84,85). O piruvato gerado ao final glicólise é convertido a lactato e excretado pela célula, resultando em um fluxo reduzido para o ciclo do ácido cítrico. Esse fenômeno se assemelha ao “efeito Warburg”, ou glicólise aeróbia, inicialmente descrito em células neoplásicas por Otto Warburg na década de 1920 (86,87). Apesar da glicólise ser menos eficiente em termos da produção de ATP por molécula de glicose quando comparada à respiração mitocondrial, as enzimas glicolíticas podem sofrer uma rápida e acentuada regulação positiva, sendo capazes de suprir a demanda energética de células com metabolismo acelerado. A ativação desse fenótipo disponibiliza precursores para vias anabólicas e pode proporcionar a manutenção da produção de ATP independentemente da oferta de oxigênio (88). A glicólise aeróbia também tem reflexos no padrão da resposta imune. A produção de ROS e NO, envolvidos na atividade microbicida, é favorecida como resultado do aumento do fluxo pela via das pentoses-fosfato (89). Além disso, foi demonstrado que a enzima glicolítica hexoquinase é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3 nessas células, o que leva à maturação e secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-18 (90). O ciclo do ácido cítrico é fragmentado, levando ao acúmulo de citrato e succinato (91). O citrato é usado para a síntese de ácidos graxos (necessários para biogênese de membranas), prostaglandinas, NO e do metabólito itaconato, que possui propriedades antimicrobianas (92,93). O succinato promove a estabilização do fator induzido pela hipóxia (HIF)-1, um importante indutor da expressão de genes relacionados à glicólise e à inflamação (94). Em contraste, os macrófagos M2 tem o ciclo do ácido cítrico íntegro e seu metabolismo é dependente principalmente da oxidação de ácidos graxos e da fosforilação oxidativa. Além disso, a via das pentoses fosfato encontra-se tipicamente suprimida na polarização M2 (95).

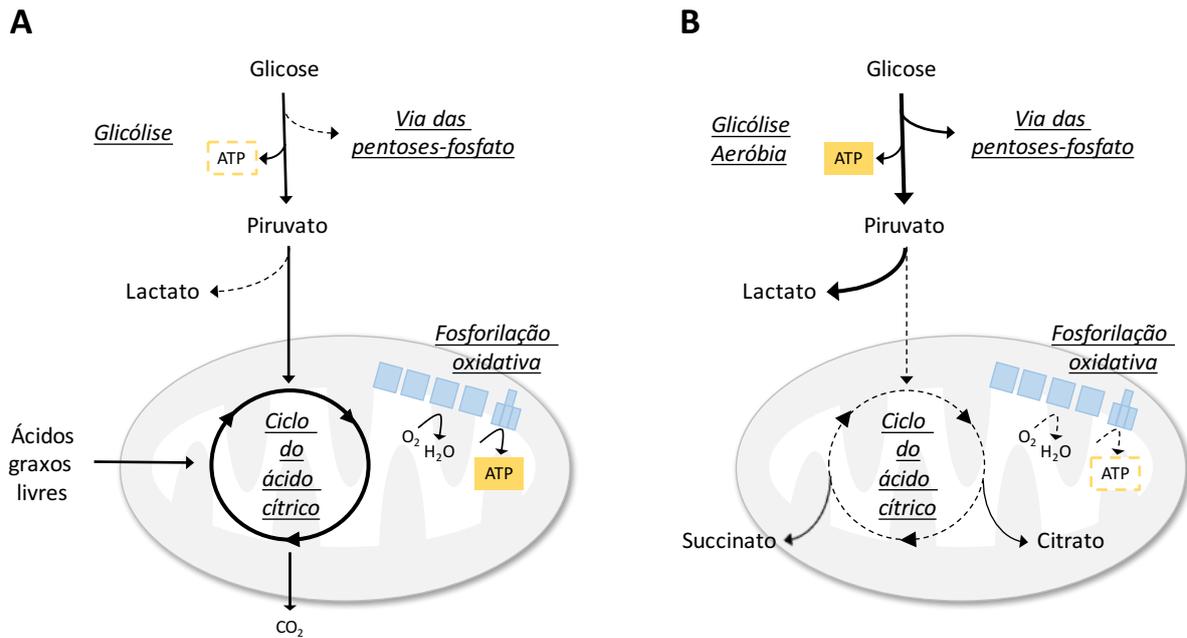


Figura 1.3: Reprogramação do metabolismo energético em macrófagos. As linhas sólidas representam o fluxo metabólico preferencial. (A) No estado quiescente ou na ativação M2, a produção de ATP é dependente principalmente do ciclo do ácido cítrico acoplado à fosforilação oxidativa na mitocôndria. (B) Na ativação M1, a glicólise passa a ser a principal fonte de ATP, e o piruvato resultante do metabolismo da glicose é convertido a lactato e excretado pela célula. O ciclo do ácido cítrico perde a integridade, resultando no acúmulo de citrato e succinato. Esses metabólitos, assim como o aumento do fluxo pela via das pentoses-fosfato, promovem a biossíntese de moléculas relacionadas à inflamação. A figura foi adaptada de (96).

Características funcionais distintas também podem ser induzidas por estímulos sequenciais. No fenômeno da tolerância à endotoxina, a exposição preliminar à baixas doses de LPS torna a célula refratária a um estímulo subsequente, exibindo atividade inflamatória reduzida. Essas células apresentam uma redução da excreção de lactato e consumo de oxigênio quando comparadas às células não ativadas, o que sugere que esse estado de hiporresponsividade está associado a um metabolismo energético globalmente suprimido (97). Mais recentemente, o conceito de *trained immunity* foi proposto, para caracterizar um tipo de memória não-específica da imunidade inata que resulta em um aumento da resposta inflamatória a estímulos microbianos condicionada por uma infecção prévia (98). Por exemplo, em um estudo que utilizou monócitos isolados do sangue de voluntários saudáveis, o pré-tratamento com a beta-glucana, um componente da parede celular do fungo *Candida Albicans*, levou a uma secreção aumentada de TNF mediante a incubação com o LPS após um intervalo de sete dias. Em paralelo, essas células apresentaram uma

transição sustentada do metabolismo para a glicólise aeróbia, mediada pela via do alvo da rapamicina (mTOR), um regulador central de processos metabólicos, e HIF-1 (99).

As células do sistema monocítico fagocitário apresentam uma grande plasticidade em resposta ao conjunto de estímulos do ambiente, e, portanto, é difícil estimar até que ponto esses modelos representam os fenótipos clínicos. Nesse contexto, os monócitos vem sendo alvo de um grande número de estudos na sepse, pela sua importância e facilidade de obtenção a partir de amostras de sangue de pacientes. Algumas das observações iniciais que associaram a sepse à imunossupressão vieram de estudos que demonstraram uma capacidade reduzida da produção de citocinas como IL-1, TNF e IL-6 após o estímulo *ex vivo* com LPS em monócitos de pacientes, o que é frequentemente descrito em analogia ao fenômeno da tolerância à endotoxina (100). A redução da expressão em monócitos do *human leucocyte antigen* (HLA)-DR, uma das principais moléculas de apresentação de antígenos, se correlaciona à um aumento da mortalidade e o surgimento de infecções secundárias na sepse, o que tem implicações como um mecanismo fisiopatológico e como um biomarcador para o monitoramento do estado de ativação imune na clínica (101,102).

Em paralelo, um conjunto crescente de evidências vem buscando caracterizar as alterações bioenergéticas em monócitos na sepse. Em uma coorte de pacientes com choque séptico, demonstrou-se uma redução precoce da respiração celular em PMBCs, provocada pela inibição da enzima ATP sintase, que foi mais acentuada nos não-sobreviventes e se reverteu com a recuperação clínica (103). Outro estudo de PBMCs de pacientes com sepse grave e choque séptico observou um desacoplamento da fosforilação oxidativa, que pôde ser reproduzido pela incubação de células de voluntários saudáveis com plasma séptico e se associou a uma redução da expressão de HLA-DR (104). Como não houve uma mensuração concomitante do metabolismo glicolítico nesses estudos, é incerto se esses achados representavam uma disfunção energética global ou a transição para a glicólise aeróbia.

Essa questão foi abordada em um experimento recente, onde PBMCs de pacientes com sepse que exibiram uma resposta pró-inflamatória após um estímulo *ex vivo* com LPS, apresentaram um aumento concomitante na secreção de lactato e produção de NAD⁺, sugestivos de um perfil glicolítico, o que não foi observado em células imunotolerantes (97). É importante ressaltar que resultados baseados na fração de PBMCs, constituída por 70 a 90% de linfócitos, não são necessariamente representativos da população de monócitos, e,

portanto, o fenótipo imunometabólico dessas células na sepse clínica ainda não está claramente definido.

1.4. Ômicas moleculares no estudo da sepse

O termo “ômica”, quando relacionado ao dogma central da biologia molecular, como em genômica, transcriptômica e proteômica, descreve metodologias que buscam a caracterização global dos componentes de uma dimensão do fluxo da informação genética (105).

Esse tipo de abordagem proporciona uma perspectiva holística, inacessível às técnicas mais tradicionais, cujo desenho experimental é focado *a priori* em questões específicas. A aquisição de dados em larga escala permite a descoberta de correlações ou padrões relevantes que não foram previamente concebidos, gerando novas hipóteses a serem exploradas, o que é particularmente útil no estudo de doenças cujo diagnóstico molecular e fisiopatologia ainda não se encontram claramente estabelecidos (106). Além disso, favorece a compreensão de processos patológicos que possuem uma dinâmica eminentemente complexa e não-linear, características que são frequentemente atribuídas à sepse (19,107). Nesse tipo de sistema, os mediadores individuais apresentam funções redundantes e variáveis de acordo com o contexto, e os fenótipos são um reflexo da “ordem emergente”, resultante da interação do conjunto de elementos que compõem módulos funcionais (108).

O número de publicações utilizando essas tecnologias para o estudo da sepse vem aumentando rapidamente, englobando todos os níveis das ômicas moleculares.

Estudos de associação genômica ampla (*genome-wide association studies* - GWAS) buscaram correlacionar variantes genéticas às características da sepse (109,110). Essas análises tipicamente utilizam plataformas comerciais para rastrear polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) comuns, que funcionam como marcadores das regiões do DNA associadas à doença, mas não tem poder discriminatório para a atribuição causal a uma mutação específica (111). Portanto, são diretamente aplicáveis apenas para predição de risco ou prognóstico. Em contraste, técnicas de sequenciamento completo do genoma ou exoma permitem a identificação precisa de mutações implicadas nas doenças, podendo sugerir mecanismos ou alvos terapêuticos (112).

No campo da transcriptômica, de forma semelhante à genômica, o estudo do perfil de expressão gênica em grandes coortes de pacientes se tornou possível pelo desenvolvimento de plataformas de microarranjo, capazes de mapear a atividade de milhares de genes a

partir sondas de sequências pré-determinadas, que detectam o RNA mensageiro (mRNA) das amostras. Mais recentemente, as técnicas de sequenciamento de nova geração (RNA-seq), que permitem também a identificação de transcritos previamente desconhecidos, estão se tornando cada vez mais difundidas. Grande parte dos estudos de transcriptômica na sepse clínica foi realizada em células do sangue. A caracterização das vias bioquímicas diferencialmente expressas em leucócitos produziu informações importantes a respeito da imunopatologia (97,113). Os padrões de expressão foram utilizados para a identificação de assinaturas gênicas de resposta da sepse, que foram propostas como marcadores de prognóstico (114). Além disso, os níveis de mRNAs foram correlacionados à SNPs para mapear regiões do DNA que controlam a expressão gênica (*expression quantitative trait loci - eQTL*), contendo variantes que podem influenciar o comportamento da doença (114). Outros estudos também exploraram mecanismos regulatórios através do sequenciamento amplo de microRNAs (115).

As proteínas são efetoras fundamentais na maior parte dos processos celulares, e portanto o seu estudo é indispensável para a compreensão da biologia das doenças. Os níveis de mRNAs são frequentemente interpretados como representativos da abundância das proteínas correspondentes, mas essa correlação por vezes é baixa em situações de estresse celular, como resultado de mecanismos de regulação pós-transcricional (116). O estudo da proteômica em amostras complexas sofreu um grande impulso pelo aperfeiçoamento de técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Essa abordagem substituiu grande parte das aplicações baseadas em eletroforese bidimensional em gel, por sua maior eficiência e sensibilidade (117). A procura de biomarcadores no plasma foi o alvo da maior parte dos estudos de proteômica na sepse clínica, resumidos na Tabela 1.6 (118). O intervalo dinâmico das concentrações das proteínas plasmáticas impõe um desafio técnico para a detecção de proteínas importantes de abundância relativamente baixa. A imunodepleção seletiva das proteínas mais abundantes vem sendo uma estratégia empregada para solucionar esse problema (119). Além das metodologias de mapeamento extensivo do proteoma, houve recentemente a emergência de técnicas de proteômica dirigida, que permitem a mensuração de dezenas de proteínas pré-selecionadas a partir de quantidades restritas de material, apresentando um grande potencial de aplicabilidade em amostras clínicas (120).

Tabela 1.6: Estudos de proteômica na sepse clínica

Autor	População do estudo	Material clínico	Metodologia	Objetivo principal
Kalenka e cols., 2006 (121)	Adultos com choque séptico	Soro	2DGE-MS	Identificação de biomarcadores de prognóstico
Shen e cols., 2006 (122)	Adultos com sepse	Plasma	LC-MS	Identificação de biomarcadores de diagnóstico
Soares e cols., 2009 (123)	Adultos com sepse por <i>A. baumannii</i>	Plasma	2DGE-MS	Identificação de biomarcadores de diagnóstico
Gong e cols., 2009 (124)	Adultos com sepse grave	Plasma	2DGE-MS	Caracterização das alterações resultantes da hemodiálise
Paiva e cols., 2010 (125)	Adulto com sepse	Soro	2DGE-MS	Caracterização das alterações ao longo da evolução da sepse (n=1)
Lin e cols., 2010 (126)	Adultos em PO de reimplante de membros inferiores	Plasma	2DGE-MS	Identificação de biomarcadores de prognóstico
Buhimschi e cols., 2011 (127)	Neonatos com sepse precoce	Soro	2DGE-MS	Identificação de biomarcadores de diagnóstico
Triantafilou e cols., 2012 (128)	Adultos com sepse	Soro	2DGE-MS	Caracterização dos ligantes da endotoxina e do ácido lipoteicóico
Daigo e cols., 2012 (129)	Adultos com sepse	Plasma e soro	LC-MS	Caracterização dos ligantes de Pentraxina-3
Langley e cols., 2013 (130)	Adultos com sepse	Plasma	LC-MS	Confecção de um modelo de prognóstico baseado na proteômica, metabolômica e dados clínicos
Su e cols., 2013 (131)	Adultos com sepse	Urina	LC-MS	Identificação de biomarcadores de prognóstico
Liu e cols., 2014 (132)	Adultos com sepse	Plaquetas	2DGE-MS	Estudo da fisiopatologia
Cao e cols., 2014 (133)	Adultos com sepse grave pulmonar	Plasma	LC-MS	Estudo das alterações em idosos
Sylvester e cols., 2014 (134)	Neonatos com enterocolite necrosante	Urina	LC-MS	Identificação Biomarcadores de diagnóstico e prognóstico
Malmström e cols., 2014 (135)	Adultos com sepse grave	Neutrófilos e plasma	LC-MS	Validação de marcadores de ativação de neutrófilos in vitro
DeCoux e cols., 2015 (136)	Adultos com choque séptico	Plasma	LC-MS	Identificação de biomarcadores de prognóstico (sobrevida)

Tabela 1.6. (continuação)

Autor	População do estudo	Material clínico	Metodologia	Objetivo principal
Pinheiro da Silva e cols, 2015 (137)	Adultos com sepse grave ou choque séptico	Plasma	LC-MS	Identificação de biomarcadores de diagnóstico
Stewart e cols., 2016 (138)	Neonatos com enterocolite necrosante	Soro	LC-MS	Identificação de biomarcadores de diagnóstico (proteômica e metabolômica)
Hashida e cols., 2016 (139)	Adultos com sepse	Soro e adsorbatos de hemofiltros	LC-MS	Identificação de biomarcadores de diagnóstico
Sharma e cols., 2017 (140)	Adultos com sepse grave ou choque séptico pulmonar	Plasma	LC-MS	Estudo da fisiopatologia

2DGE: Eletroforese bidimensional em gel; LC: cromatografia líquida; MS: espectrometria de massas

A metabolômica estuda pequenas moléculas como carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, produzidos durante reações bioquímicas. A detecção desses metabólitos é baseada principalmente em técnicas de cromatografia e espectrometria de massas ou espectroscopia por ressonância nuclear magnética (141). Esse tipo análise acrescenta uma importante camada de informação às outras ômicas, já que reflete o panorama das alterações do metabolismo decorrentes das doenças. De forma semelhante à proteômica, os estudos de metabolômica na sepse até se concentraram na caracterização do perfil dos metabólitos do plasma, buscando a associação com desfechos clínicos como mortalidade ou resposta à terapia (142,143).

O processamento e interpretação do grande volume de informações que sai das plataformas tecnológicas foram favorecidos pelo desenvolvimento de ferramentas computacionais sofisticadas e formatos padronizados para a reportagem de genes seus produtos (144). Além disso, os grupos de pesquisa vem sendo cada vez mais incentivados por agências de fomento e periódicos científicos a disponibilizarem os dados gerados em repositórios públicos. Com isso, torna-se possível a reanálise dos dados por outros grupos com objetivos diferentes do original, bem como a integração dos dados de estudos semelhantes, o que amplia a confiabilidade e o contexto dos resultados de estudos individuais e pode ser um instrumento valioso para a proposição e validação de hipóteses (145).

2 Objetivos

Estudar as alterações relacionadas ao fenótipo metabólico e inflamatório em monócitos do sangue periférico de pacientes com sepse:

- Estudar as alterações do metabolismo energético decorrentes da ativação inflamatória *in vitro* de macrófagos e monócitos.
- Caracterizar de forma abrangente o proteoma dos monócitos de pacientes na fase aguda da sepse, comparando-o com a fase de recuperação e voluntários saudáveis.
- Realizar a análise funcional e de interações entre as proteínas mapeadas no proteoma objetivando a caracterização do fenótipo imunometabólico.
- Estudar seletivamente as alterações das vias metabólicas dos monócitos dos pacientes sépticos através de um experimento de proteômica dirigida.

3 Material e métodos

3.1 População do estudo

Foi constituída uma coorte prospectiva, multicêntrica, de pacientes adultos (>18 anos) com sepse grave e choque séptico, diagnosticados de acordo com os critérios da 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference (12), internados nas UTIs dos seguintes hospitais na cidade do Rio de Janeiro: São Lucas, Copa D`or e Instituto Nacional de Infectologia (INI – FIOCRUZ). A coleta das amostras de sangue dos pacientes com sepse foi realizada após consentimento da participação através da assinatura de TCLE (Anexo 1) pelo paciente ou seu responsável dentro das primeiras 72 horas a partir diagnóstico (grupo Sepse) e antes da alta da UTI (grupo Recuperação). O grupo Controle foi constituído de voluntários saudáveis. Foram excluídos pacientes gestantes, com SIDA, neoplasias avançadas ou hematológicas e em uso de quimioterapia. Os pacientes foram acompanhados até o óbito ou alta hospitalar. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do IPEC/FIOCRUZ sob o número 059/2011.

Os escores *Simplified Acute Physiological Score (SAPS)-3* (146) e *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)* (147) foram calculados a partir do monitoramento das seguintes variáveis clínicas e laboratoriais: pressão arterial, uso e dose de aminas vasopressoras, frequência cardíaca, frequência respiratória, uso de ventilação mecânica, temperatura axilar, escala de coma de Glasgow, leucograma, hematócrito, plaquetometria, dosagem de creatinina, débito urinário, bilirrubinas totais, gases arteriais, bem como o motivo da internação e comorbidades.

Hemoculturas e culturas de fontes prováveis de infecção, determinadas de acordo com os exames clínicos, laboratoriais e de imagem dos pacientes, foram coletadas de acordo com as recomendações da Campanha de Sobrevivência à Sepse (39). O tratamento com antibióticos foi decidido de acordo com os médicos da UTI, em conjunto com as orientações das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar.

3.2 Isolamento de monócitos

Vinte mililitros de sangue foram coletados por um acesso venoso central (grupo Sepse) ou punção venosa periférica (grupos Recuperação e Controle) em uma seringa sem anticoagulante e transferidos imediatamente para tubos de preparação celular contendo heparina sódica (Vacutainer CPT, BD Biosciences). O transporte da amostra dos hospitais ao laboratório foi realizado em temperatura entre 20-25°C, com o início do processamento

ocorrendo em tempo inferior a 90 minutos. Os tubos foram centrifugados a 1700 x g por 25 minutos à temperatura de 20°C. A camada de células mononucleares (PBMC) foi transferida para um tubo cônico de centrífuga e lavada duas vezes com PBS (centrifugação de 300 g por 15 minutos a 20°C). Em seguida, os monócitos foram separados por uma técnica imunomagnética baseada em anticorpos anti-CD14 (kit para seleção positiva de CD14 humano EasySep, StemCell Technologies). Foi preparada uma suspensão das células a uma concentração de 1×10^8 /mL em PBS contendo 1 mM de EDTA e 0.5% (m/v) de albumina do soro bovino, que foi incubada com complexos tetraméricos de anticorpos anti-CD14/anti-dextran (100 µL/mL da suspensão) por 15 minutos e com esferas magnéticas cobertas com dextran (100 µL/mL da suspensão) por 10 minutos, à temperatura ambiente. O volume da suspensão foi ajustado para 2,5 ml e os monócitos (CD14+) foram separados pela exposição a um campo magnético por 10 minutos, seguida de duas lavagens (suspensão em 2,5 ml e exposição ao campo magnético por 5 minutos). A viabilidade (> 95% de células viáveis) foi avaliada pela marcação com azul de Trypan. A pureza (> 90% CD14+) foi avaliada por citometria de fluxo.

3.3 Estímulo in vitro com LPS

Foram utilizadas células de linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC) ou PBMCs obtidas de voluntários saudáveis conforme descrito no item 3.2, mantidas durante os experimentos em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone), 1mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células RAW foram colocadas em placas de cultura de 12 poços com 1×10^6 células/poço para os experimentos de citometria de fluxo e excreção de lactato ou 96 poços com 5×10^4 células/poço para os experimentos de mensuração do ATP celular, e incubadas por 18 horas 37°C em uma estufa de CO₂. As PBMCs foram transferidas para tubos de polipropileno de 12 x 75-mm para cultura (Falcon, BD biosciences) com 2×10^6 células/ml. Em seguida, as células foram estimuladas com 100 ng/ml de LPS de *E. coli* sorotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich) por 24 horas a 37°C em uma atmosfera de CO₂ a 5%.

3.4 Citometria de fluxo

A aquisição e análise de eventos foi realizada utilizando-se o programa CellQuest Pro (BD Biosciences) em um citômetro de três cores (BD FACSCalibur, BD Biosciences). Para cada tubo, o janelamento (*gating*) de monócitos foi realizado pelas características de

granulosidade combinadas à marcação pelo anticorpo anti-CD14 (figura).

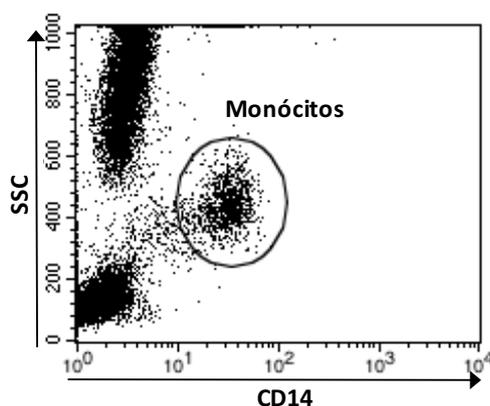


Figura 3.1: Metodologia para o janelamento de monócitos. SSC (*side scatter*): dispersão lateral do laser.

3.4.1 Expressão de HLA-DR e GLUT-1 na superfície de monócitos

Para a análise das amostras clínicas, alíquotas de 100 μ L de sangue coletadas em tubos contendo EDTA (Vacutainer, BD biosciences) foram marcadas com um anticorpo anti-CD14 PeCP-Cy5.5 (5 μ L - 0.5 μ g, eBioscience) combinados com anti-HLA-DR PE (5 μ L - 0.25 μ g, eBioscience) ou anti-GLUT-1 PE (20 μ L - 0.5 μ g, R&D Systems) e seus controles isotípicos por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas com 2 ml de um tampão para lise de hemácias (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences) por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas três vezes com PBS (centrifugação de 5 minutos a 500 x g com descarte do sobrenadante), fixadas em paraformaldeído 1% (m/v) e analisadas em menos de 2 horas. Foram 1500 eventos na janela de monócitos (figura 3.1). Para análise das culturas de PBMCs as células foram distribuídas em alíquotas de 100 μ L contendo 10⁶ células em PBS com 2% (v/v) de soro fetal bovino. Em seguida foram marcadas com os anticorpos anti-CD14 PerCP-Cy5.5 e anti-GLUT-1 PE (mesmas quantidades descritas acima) por 30 minutos a 4°C e processadas conforme descrito para as amostras clínicas, sendo adquiridos 5.000 eventos na janela de monócitos.

3.4.2 Ensaio de captação de glicose

PBMCs ou macrófagos murinos RAW 264.7 foram incubados com o análogo de glicose 2-NBDG (15 μ M ou 100 μ M, respectivamente; Cayman Chemical) em meio RPMI sem glicose (Gibco) por 30 minutos a 37°C ou a 4°C (controle negativo). Nos experimentos com macrófagos RAW, as células foram lavadas com PBS a 4°C, coletadas por raspagem, distribuídas em alíquotas de 100 μ L contendo 10⁶ células e analisadas imediatamente, com

aquisição de 10.000 eventos. Nos experimentos com PBMCs, as células foram adicionalmente incubadas com anti-CD14 PeCP-Cy5.5 (5 μ L - 0.5 μ g, eBioscience), por 30 minutos a 4°C, lavadas com PBS e analisadas imediatamente. Foram adquiridos 5.000 eventos na janela de monócitos.

3.5 Mensuração de ATP e lactato

A mensuração de ATP celular foi realizada utilizando-se um ensaio bioluminescente baseado na reação da luciferase (ATPlite, PerkinElmer), conforme as instruções do fabricante: em uma placa de 96 poços contendo as células em 100 μ L de meio de cultura à temperatura ambiente, foram adicionados 100 μ L dos reagentes por poço. A placa foi agitada por 2 minutos em um agitador orbital e a luminescência resultante foi medida em um luminômetro (Spectramax L, Molecular Devices). Para a inibição da cadeia transportadora de elétrons, as células foram incubadas com antimicina A (Sigma-Aldrich) a uma concentração de 2 μ g/ml por 2 minutos imediatamente antes da mensuração do ATP.

Para a mensuração do lactato no sobrenadante das culturas de células foi utilizado um ensaio colorimétrico baseado na reação da lactato oxidase (Labtest). A 100 μ L de cada amostra foi adicionado 1 ml do reagente e as amostras foram incubadas por 5 minutos a 37°C. Em seguida, a absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) com filtro de 550 nm e a concentração de lactato foi calculada de acordo com a absorbância de uma amostra padrão.

3.6 Proteômica shotgun

As etapas do experimento de proteômica shotgun encontram-se resumidas na Figura 3.2 e serão especificadas nas próximas seções.

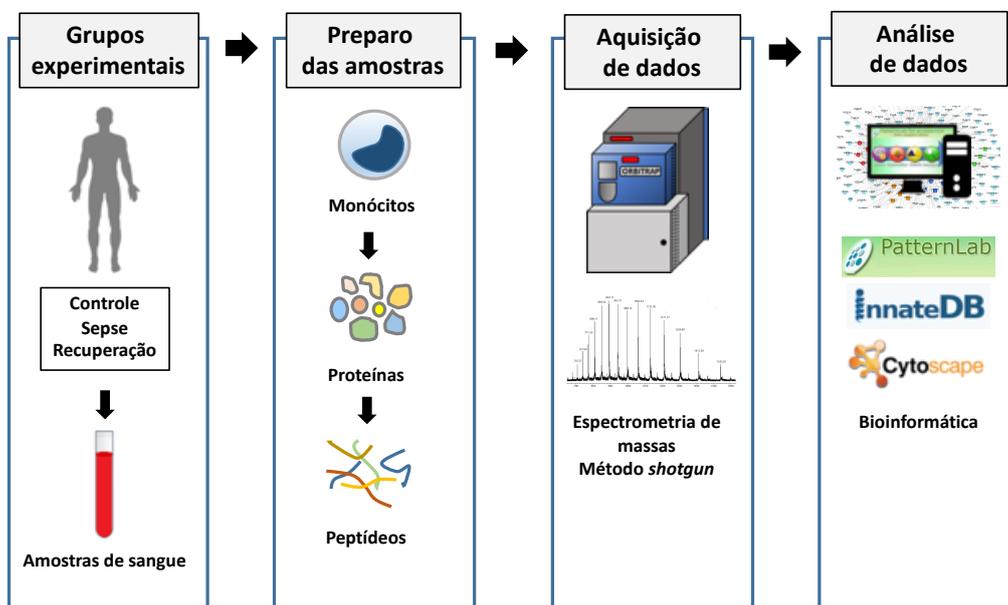


Figura 3.2: fluxo de trabalho do experimento de proteômica *shotgun*

3.6.1 Preparo das amostras

As amostras de monócitos isolados foram descongeladas a 4 °C, suspensas em 115 µL de uma solução do agente surfactante Rapigest SF (Waters) 0,1% (m/v) em bicarbonato de amônio 50 mM, e centrifugadas a 20.000 x g por 30 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram separados e a concentração proteica foi determinada por leitura de absorvância a 280 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Alíquotas de 50 µg de proteína de cada amostra foram reduzidas em ditioneitol (3 horas a 37 °C, concentração final de 10 mM) e alquiladas em iodoacetamida (30 minutos no escuro à temperatura ambiente, concentração final de 25 mM). Em seguida, foram incubadas com tripsina (Promega) 1:50 (m/m) a 37 °C por 19 horas e a 56 °C por 45 minutos em um termobloco (Eppendorf). A reação foi interrompida pela adição de ácido trifluoroacético (TFA) a uma concentração final de 1% (v/v). Os peptídeos tripticos foram purificados em microcolunas de fase reversa, preparadas no laboratório com ponteiros de 200 µL empacotadas com 10 µL de resina POROS R2 (Applied Biosystems) e membrana EMPORE C8 (3M). As microcolunas foram previamente equilibradas com 10 µL de TFA 1% (v/v); as amostras foram aplicadas e em seguida foram feitas 2 lavagens com 20 µL de TFA 0,1%; os peptídeos foram eluídos com 20 µL de TFA 0,1% (v/v) mais acetonitrila (ACN) 70% (v/v). Ao final, as amostras foram secas em um concentrador a vácuo e

suspensas em ácido fórmico (FA) 1% (v/v). A concentração de peptídeos foi determinada por leitura de absorvância a 280 nm e as amostras foram armazenadas a -20 °C para as análises por espectrometria de massas.

3.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As análises por eletroforese foram conduzidas de acordo com o método descrito por Laemmli (148). As amostras foram corridas em géis de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12% a 200V por 40 minutos utilizando sistemas Mini-Protean III (Bio-Rad Laboratories). Os padrões de peso molecular utilizados foram os do *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare). Após a corrida eletroforética, os géis foram revelados por impregnação por prata (149). A aquisição das imagens dos géis foi feita com o auxílio do programa Adobe Photoshop Elements (Adobe Systems Incorporated) conectado a um scanner ImageScanner III (GE Healthcare).

3.6.3 Análise por espectrometria de massas

Cerca de 1 µg de cada amostra foi submetida à análise por nLC-nESI MS/MS (Figuras 3.3 a 3.5) em sistema cromatográfico Ultimate 3000 (Dionex) acoplado ao espectrômetro de massas Q-Exactive Plus (Thermo). Para tal, a amostra foi inicialmente aplicada em uma coluna de guarda com 2 cm (100 µm de diâmetro interno) empacotada com partículas de sílica de 5 µm de diâmetro e poro de 200 Å, (Magic C18 AQ, Michrom Bioresources, EUA). Em seguida, a amostra foi fracionada em coluna de 40 cm, *PicoFrit™ Self-Pack* (75 µm de diâmetro interno) e ponta de 10 µm (New Objective), empacotada com sílica de 1,9 µm, *ReproSil-Pur 120 C18-AQ* (MAISCH/Alemanha). As amostras foram carregadas em FA 0,1% (v/v) e ACN 2% (eluente A), na pré-coluna, com fluxo de 2 µL/min, enquanto que a separação cromatográfica ocorreu a 200 nL/min. Os peptídeos foram eluídos com um gradiente de 2 a 45% de FA 0,1% (v/v) em acetonitrila (eluente B) durante 172 min, seguido de gradiente 40-80% B em 4 min e lavagem a 80% B por 2 min. Na entrada do espectrômetro, a voltagem do spray foi ajustada para 1,9 kV, sem fluxo de gás auxiliar e com a temperatura do capilar a 250 °C. A voltagem das lentes foi ajustadas para 60 V. Os espectros dos precursores, modo MS (*full scan MS*), foram adquiridos com um microscan no analisador Orbitrap, com resolução de 70.000 (*Full Width Half Maximum, FWHM* para m/z 200), valor de *Automatic Gain Control* (AGC) definido para 1×10^6 e tempo máximo de injeção de 250 ms. Até 12 íons precursores mais abundantes de cada varredura (de intervalo de m/z 300 a 1.500) foram sequencialmente submetidos à fragmentação por

dissociação induzida por colisão de alta energia (*Higher-energy collisional dissociation*, HCD) e os íons-fragmento foram analisados novamente no Orbitrap à resolução 17.500, no modo MS/MS, usando os seguintes parâmetros: valor de AGC definido para 5×10^4 , tempo de preenchimento máximo de 50 ms e limite de sinal mínimo de 10^5 contagens. A fragmentação do íon precursor foi realizada utilizando a energia de colisão normalizada de 35%, janela de isolamento de 2 m/z, tempo de ativação de 50 ms e tempo de permanência de um íon na lista de exclusão (exclusão dinâmica) de 60 s. Íons de carga única e íons sem estado de carga definido não foram submetidos a MS/MS. Os dados foram obtidos em triplicata técnica, utilizando o software Xcalibur (versão 3.0.63). O espectrômetro de massas foi calibrado externamente, utilizando uma mistura composta por cafeína, peptídeo MRFA e Ultramark 1621, tal como recomendado pelo fabricante do instrumento.

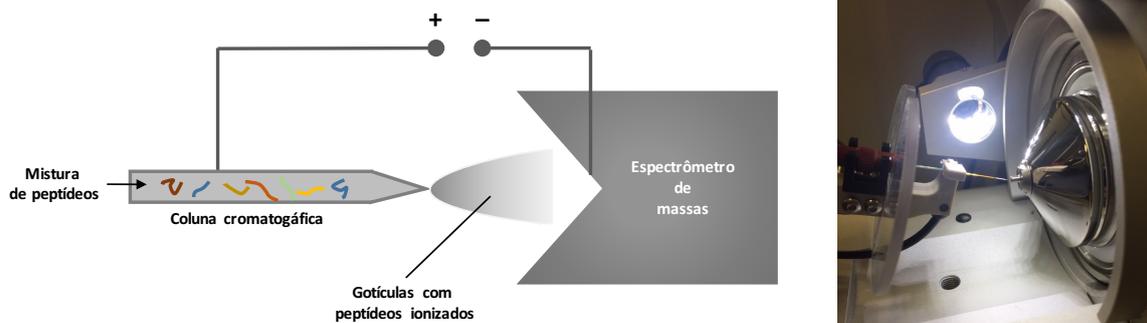


Figura 3.3: Nanocromatografia líquida seguida de ionização por *eletrospray* (nLC-nESI). Os peptídeos em solução ácida (protonados) são bombeados através de uma coluna cromatográfica capilar, cuja extremidade distal é afilada e posicionada próxima à entrada do espectrômetro. A exposição a uma alta voltagem faz com que a amostra saia da coluna na forma de um jato, composto por gotículas carregadas eletricamente que sofrem fragmentações sucessivas à medida que avançam, de forma que os peptídeos atingem a entrada do espectrômetro em fase gasosa.

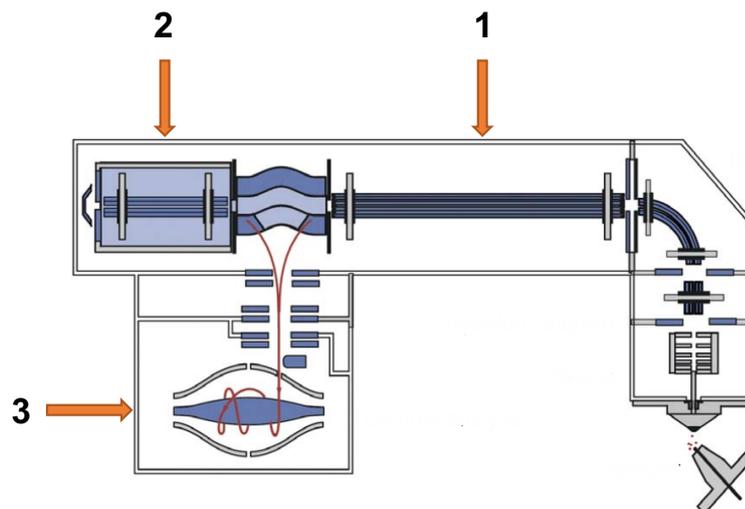


Figura 3.4: Espectrômetro de massas Q Exactive Plus (150):

1 - Filtro de massas do tipo quadrupolo: Permite a seleção dos valores de m/z que seguirão adiante para serem detectados. Composto de quatro hastes dispostas paralelamente em pares diametralmente opostos, conectados eletricamente. A cada par de polos pode se aplicar uma corrente elétrica direta e alternada (na forma de radiofrequência). As correntes direta e alternada podem ser combinadas de forma a instabilizar a trajetória de íons que passam no interior do quadrupolo, de acordo com valores definidos de m/z , impedindo a sua progressão pela colisão com as hastes.

2 - Câmara de colisão do tipo HCD (*higher-energy collision dissociation*): consiste de um multipolo contendo um gás inerte (como nitrogênio). Ao entrarem na câmara, os íons precursores colidem com o gás, fazendo com que a energia cinética seja transferida para os analitos na forma de energia vibracional, o que resulta na sua fragmentação, preferencialmente na ligação peptídica.

3 - Analisador de massas do tipo orbitrap: consiste de um eletrodo externo bipartido que envolve um eletrodo interno fusiforme. A atração eletrostática e a geometria do analisador mantêm os íons aprisionados em um movimento orbital em torno do eletrodo interno. A frequência da oscilação axial dos íons é detectada pelo eletrodo externo na forma de imagem da corrente, e os valores de m/z são obtidos pela aplicação de uma transformada de Fourier.

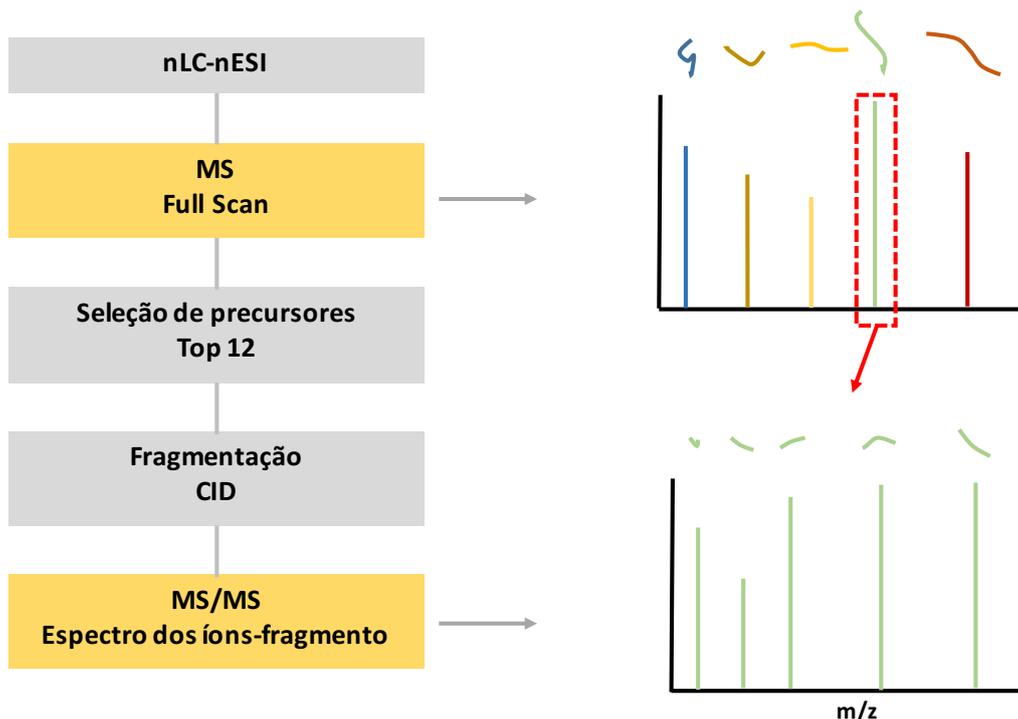


Figura 3.5: Aquisição dependente de dados (DDA) da abordagem *shotgun* utilizando o espectrômetro de massas Q Exactive Plus. Em um experimento de proteômica *shotgun*, o sistema adquire um *full scan* (modo MS), onde o quadrupolo opera somente com radiofrequência, permitindo a passagem de todos os íons, que são então concentrados e introduzidos no Orbitrap para a análise. Em seguida, no modo MS/MS, os peptídeos precursores selecionados para a análise a partir do *full scan* são filtrados pelo quadrupolo, agora operando com corrente direta e radiofrequência determinadas para permitir a passagem somente dos valores de m/z desejados. Os peptídeos passam então para a câmara de colisão, que irá gerar os íons-fragmento, posteriormente direcionados ao Orbitrap para a análise.

3.6.4 Identificação de peptídeos e inferência de proteínas

A identificação dos peptídeos a partir dos dados brutos (*raw files*) gerados pelo Xcalibur, foi realizada com a ferramenta Comet (versão 2013.02), dentro do ambiente computacional PatternLab (versão 4.0) (151). A estratégia de identificação baseia-se na correlação dos espectros experimentais de MS/MS com espectros de fragmentação teóricos, derivados de sequências obtidas em um banco de dados (*Peptide Spectrum Match* - PSM) (Figura 3.6). As buscas foram realizadas contra o banco de dados Nextprot (contendo 42.135 sequências de proteínas, baixado em 29 de janeiro de 2017, <http://www.nextprot.org/>), incluindo 110 contaminantes comuns (e.g., tripsina, queratina, BSA), além de sequências proteicas invertidas, formando um banco reverso (estratégia

Target-decoy) (152). Para eliminar a redundância do banco, sequências contidas dentro de outra sequência (com 100% de identidade) foram removidas e suas respectivas descrições foram incluídas na descrição da proteína com a sequência mais extensa. Os parâmetros da busca foram: peptídeos trípticos e semi-trípticos, com massas entre 500 e 5.000 Da, até 2 sítios de clivagem perdidos, modificações: carbamidometilação (Cys), oxidação (Met) e tolerância inicial de 40 ppm para íons precursores. A filtragem dos PSMs foi feita usando o módulo *Search Engine Processor* (SEPro) da seguinte maneira: as identificações foram agrupadas pelo número de extremidades enzimaticamente clivadas (tríptico e semi-tríptico), resultando em dois subgrupos distintos. Para cada resultado, os escores de cada métrica (XCorr, DeltaCN e ZScore) foram usados para gerar um discriminador Bayesiano, aceitando até 1% de falsas descobertas (*false discovery rate*, FDR), estimadas pelo número de identificações de sequências do banco reverso. Sequências com menos de 6 resíduos de aminoácidos foram excluídas da análise. Os resultados foram adicionalmente filtrados para aceitar apenas PSMs com erro de massa inferior a 5 ppm e identificações de proteínas suportadas por duas ou mais identificações independentes (e.g., identificação de um peptídeo com diferentes estados de carga, com e sem modificação ou identificação de dois peptídeos diferentes). Proteínas identificadas por um único espectro (*1 hit wonder*) com XCorr abaixo de 2 foram excluídas. A lista final de proteínas mapeadas foi agrupada de acordo com a máxima parcimônia.

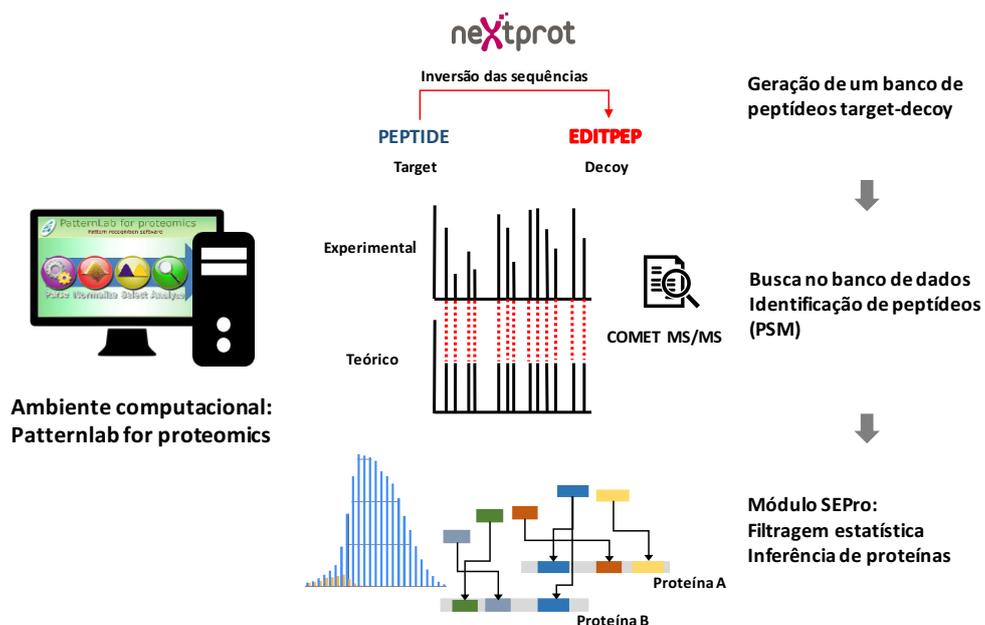


Figura 3.6: Esquema do processo de identificação de peptídeos e inferência de proteínas no ambiente computacional PatternLab.

3.6.5 Análise das proteínas diferencialmente reguladas

As proteínas diferencialmente abundantes foram determinadas pelo módulo TFold do Patternlab, com um q-valor (Benjamini-Hotchberg) de 0.05 (153,154). O módulo *area-proportional Venn diagram* exibiu todas as proteínas mapeadas para cada condição.

Os *heat maps* foram criados utilizando as ferramentas *gplots* (<https://cran.r-project.org/package=gplots>) e Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>). Os valores da abundância foram normalizados por *z-scores*, calculados a partir da fórmula: $Z\ score = (\text{valor da abundância} - \text{médiaL}) / \text{SDL}$ onde *médiaL* é o valor médio e *SDL* é o desvio padrão da abundância da proteína. O escore MDP (*Molecular Degree of Perturbation*) das amostras individuais foi calculado através da ferramenta *mdp* (<http://bioconductor.org/packages/mdp/>), a partir da média dos 25% mais elevados *z-scores* das proteínas dos grupos Sepse e Recuperação, calculados tendo como referência o grupo Controle para computar as médias e desvios padrão (155).

A análise funcional foi realizada utilizando a ferramenta *pathway analysis* da base de dados InnateDB (<http://www.innatedb.com>) (156), empregando a metodologia de *over-representation analysis* (algoritmo Hipergeométrico, correção pelo método de Benjamini-Hochberg) a partir das anotações de vias da base Reactome (157). As redes de interação proteína-proteína foram criadas no programa Cytoscape (versão 3.4.0) (158) utilizando o *Proteomics Standard Initiative Common QUery InterfaCe* (PSICQUIC) com anotações validadas experimentalmente da base InnateDB. As análises topológicas das redes foram realizadas utilizando a ferramenta *cytoHubba* pela metodologia de *Maximal Clique Centrality* (159).

3.7 Proteômica dirigida pela técnica de monitoramento de reação selecionada (SRM)

3.7.1 Desenvolvimento do ensaio de SRM

Para a análise de SRM (figuras 3.7 e 3.8) foram selecionadas proteínas envolvidas nas vias glicolítica, beta-oxidação, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. A confecção do método foi realizada utilizando o programa Skyline (versão 4.0) (160). Uma biblioteca de espectros de massas foi construída a partir da análise dependente de dados das amostras (Seção 3.6) e do banco *NIST_human_QTOF_2012-04-20*, baixado do repositório SRM atlas (<http://www.srmatlas.org/>) diretamente pela ferramenta de edição de biblioteca espectral (*Peptide settings*) do Skyline. O arquivo FASTA das sequências utilizado para construir a

biblioteca de espectros (sem as sequências *decoy*) foi utilizado como o proteoma de base (*background*). Para o refinamento da lista de peptídeos-alvo, foram selecionadas sequências únicas para a proteína (proteotípicas) e com boa detectabilidade por espectrometria de massas, evitando-se aquelas com risco de sofrerem modificações químicas ou biológicas e *missed cleavages* pela tripsina. A validação das transições e a determinação dos tempos de retenção foram realizadas por corridas sem agendamento em um *pool* das amostras clínicas. As energias de colisão foram otimizadas utilizando a função de edição da equação da energia de colisão do espectrômetro Thermo TSQ Quantiva na ferramenta *Transition settings* do Skyline. A atribuição automática dos picos foi verificada manualmente, pelo padrão de eluição das transições e intensidade relativa dos íons-fragmento em comparação à biblioteca de espectros.

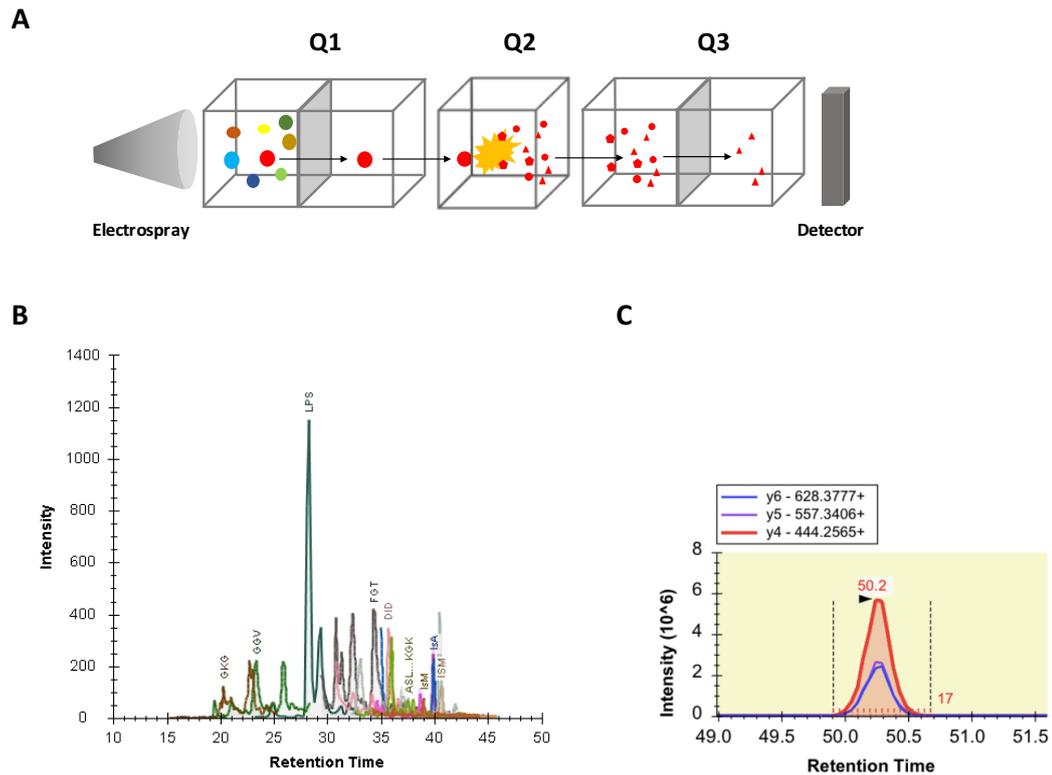


Figura 3.7: Proteômica baseada no monitoramento de reação selecionada (*selected reaction monitoring*, SRM). (A) Em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, o primeiro quadrupolo (Q1) filtra um peptídeo pré-selecionado (íon precursor), que sofre fragmentação por dissociação induzida por colisão no segundo quadrupolo (Q2). Um fragmento pré-determinado é então filtrado pelo terceiro quadrupolo (Q3). O espectrômetro monitora uma transição (par do íon precursor e um íon-fragmento) por vez, percorrendo a lista das transições selecionadas em ciclos. (B) A determinação dos tempos de retenção cromatográficos dos peptídeos-alvo permite o “agendamento”, ou seja, a programação do momento da cromatografia onde a presença de uma determinada transição será monitorada. O agendamento reduz o tempo de ciclo do espectrômetro, aumentando a resolução (número de pontos de detecção) dos cromatogramas extraídos dos fragmentos (C), cujas áreas sob as curvas integradas são utilizadas como parâmetro para a quantificação.

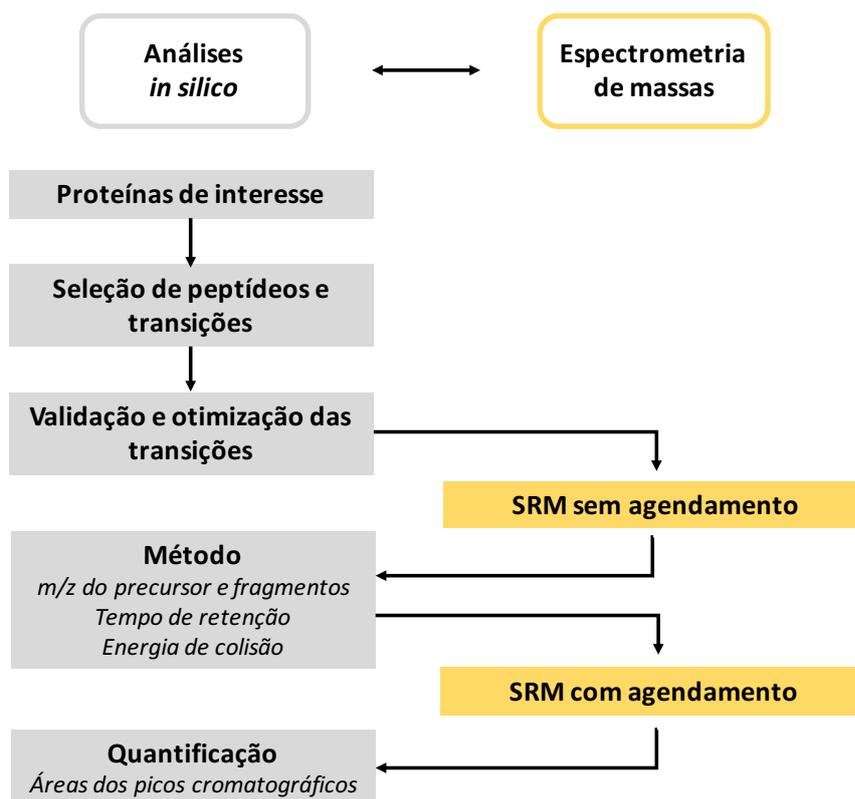


Figura 3.8: Fluxo de trabalho do experimento de proteômica dirigida por SRM. Uma lista de proteínas de interesse foi confeccionada a partir da hipótese e transições com boa detectabilidade e únicas para as proteínas-alvo foram selecionadas utilizando como referência bibliotecas de espectros de experimentos prévios. O tempo de retenção cromatográfico para cada peptídeo foi determinado e as transições foram validadas em aquisições sem agendamento, através da quais foi configurado o método final para a análise das amostras em aquisições com agendamento.

3.7.2 Análise por espectrometria de massas

As análises de SRM foram realizadas utilizando o sistema de cromatografia Easy II (Proxeon) acoplado ao espectrômetro de massas TSQ Quantiva (Thermo Scientific). As amostras de peptídeos preparadas conforme descrito na Seção 3.6.1 foram aplicadas em duplicatas técnicas (total de 1 µg em 8 µL) inicialmente em uma pré-coluna de 2 cm de comprimento, 75 µm de diâmetro interno, empacotada com partícula de sílica de tamanho de 3 µm e 100 Å (Acclaim PepMap 100, Thermo Scientific), e em seguida separadas em uma coluna analítica PicoChip (New Objective) de 10,5 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, empacotada com partícula de sílica de diâmetro de 3 µm (H354 ReproSil-Pur C18-AQ 120 Å). Foram utilizados 0,1% (v/v) de FA e 5% de ACN em água como fase móvel A e 0,1% (v/v) de FA e 5% de água ultrapura em ACN como fase móvel B. As amostras foram

separadas com fluxo de 320 nL/min no seguinte programa de eluição: gradiente de 5-45% B em 40 minutos, gradiente de 45-95% B em 10 minutos, e 95% B por 10 minutos. O espectrômetro de massas foi operado em modo positivo, com voltagem do spray de 2600 V, temperatura do capilar de transferência de íons de 280 °C e resolução de 0.7 (FWHM para 508,2 m/z) em Q1 e Q3. Para fragmentação dos íons precursores, foi utilizada Dissociação Induzida por Colisão (*Collision Induced Dissociation* - CID) com 1,5 mTorr e energia de colisão ajustada para cada íon segundo a lista de inclusão usada para cada experimento. As transições foram monitoradas em modo SRM, com uma janela de 7 minutos para os tempos de retenção e um tempo de ciclo de 2 ms.

3.7.3 Análise quantitativa

A integração automática dos picos foi realizada pelo programa Skyline e verificada manualmente. A quantificação relativa foi baseada na comparação das somas das áreas dos picos das transições. A abundância diferencial entre as replicatas das amostras foi avaliada utilizando a ferramenta MSstats (161).

4 Resultados

4.1 Efeito da ativação celular sobre o metabolismo glicolítico

Em experimentos *in vitro* estudamos o efeito da ativação celular sobre a origem da síntese de ATP. Em macrófagos murinos não estimulados, o tratamento com a antimicina A, um inibidor específico do complexo III da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, provocou uma redução de 64.6% na concentração de ATP celular, enquanto que a redução do ATP nas células ativadas por LPS foi de 22.6%. Esse efeito indica uma menor dependência da fosforilação oxidativa para a geração de ATP nas células ativadas pelo LPS (Figura 4.1)

Paralelamente, observamos, após a ativação de macrófagos murinos com LPS, um aumento da captação do análogo fluorescente de glicose 2-NBDG e da excreção de lactato em relação ao grupo controle, não ativado. Pudemos observar uma resposta semelhante em monócitos humanos, acompanhada de um aumento na expressão do receptor de captação de glicose GLUT-1 (Figura 4.2).

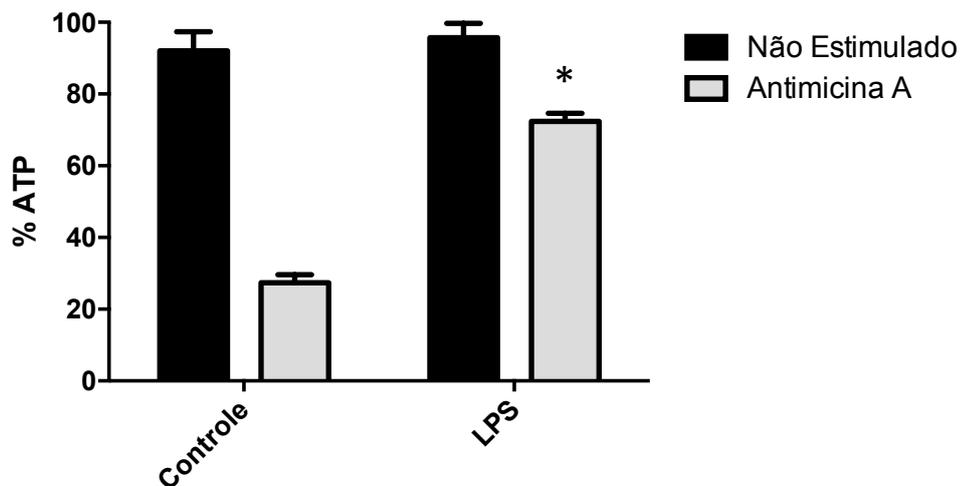


Figura 4.1: Efeito da antimicina A sobre o ATP celular em macrófagos murinos ativados: Células RAW 264.7 foram incubadas com LPS (100 ng/ml) por 24h. Em seguida foram tratadas com antimicina A, um inibidor da cadeia transportadora de elétrons (2 µg/ml por 5 min) e o ATP celular foi medido. Observou-se nas células ativadas pelo LPS uma menor redução do ATP celular quando tratadas com a antimicina A. Dados representados como média com desvio padrão da porcentagem relativa aos respectivos grupos não tratados com a antimicina A; n=3. * p < 0,05 (ANOVA)

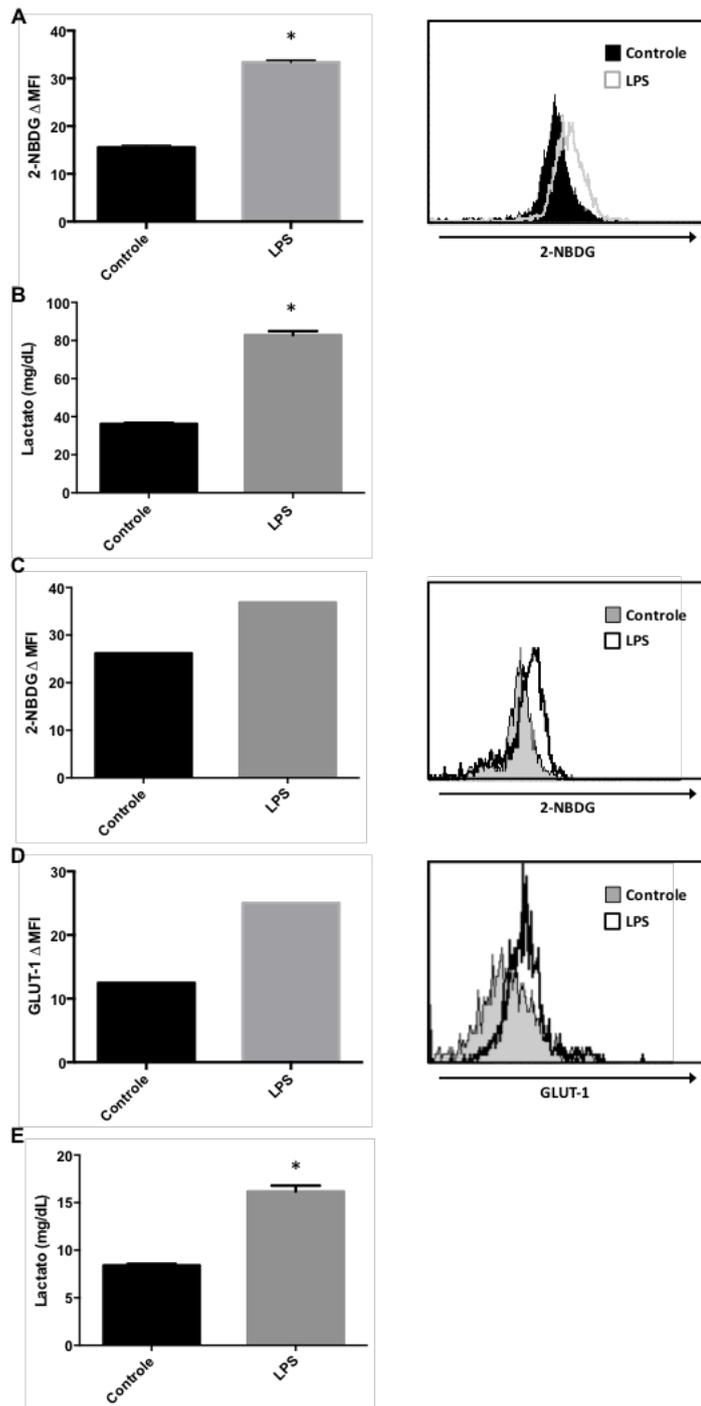


Figura 4.2.: Glicólise em células ativadas pelo LPS. Macrófagos murinos RAW 264.7 (A e B) ou monócitos humanos do sangue periférico de voluntários saudáveis (C, D e E) foram incubados com LPS (100 ng/ml) por 24h. (A, C) Captação 2-NBDG medida por citometria de fluxo. (B, E) Excreção de lactato. (D) expressão do receptor de captação de glicose GLUT-1 medida por citometria de fluxo (em A, B e E, as barras representam média com desvio padrão de n=3; em C e D está representado 1 de 2 experimentos com resultados semelhantes e n=1). Δ MFI: mediana da intensidade de fluorescência (MFI) do teste subtraída da MFI do controle isotópico. Histogramas representativos dos experimentos de citometria estão demonstrados. Em. * p < 0,05 (teste T de student).

4.2 Expressão de HLA-DR em pacientes com sepse

A Figura 4.3 representa experimentos de citometria de fluxo para a expressão de HLA-DR na superfície de monócitos do sangue periférico. Essa molécula de apresentação de antígenos foi estabelecida como um biomarcador de prognóstico e imunossupressão na sepse (101,102). Observamos uma redução da expressão de HLA-DR nos monócitos da maioria dos pacientes sépticos em relação aos controles.

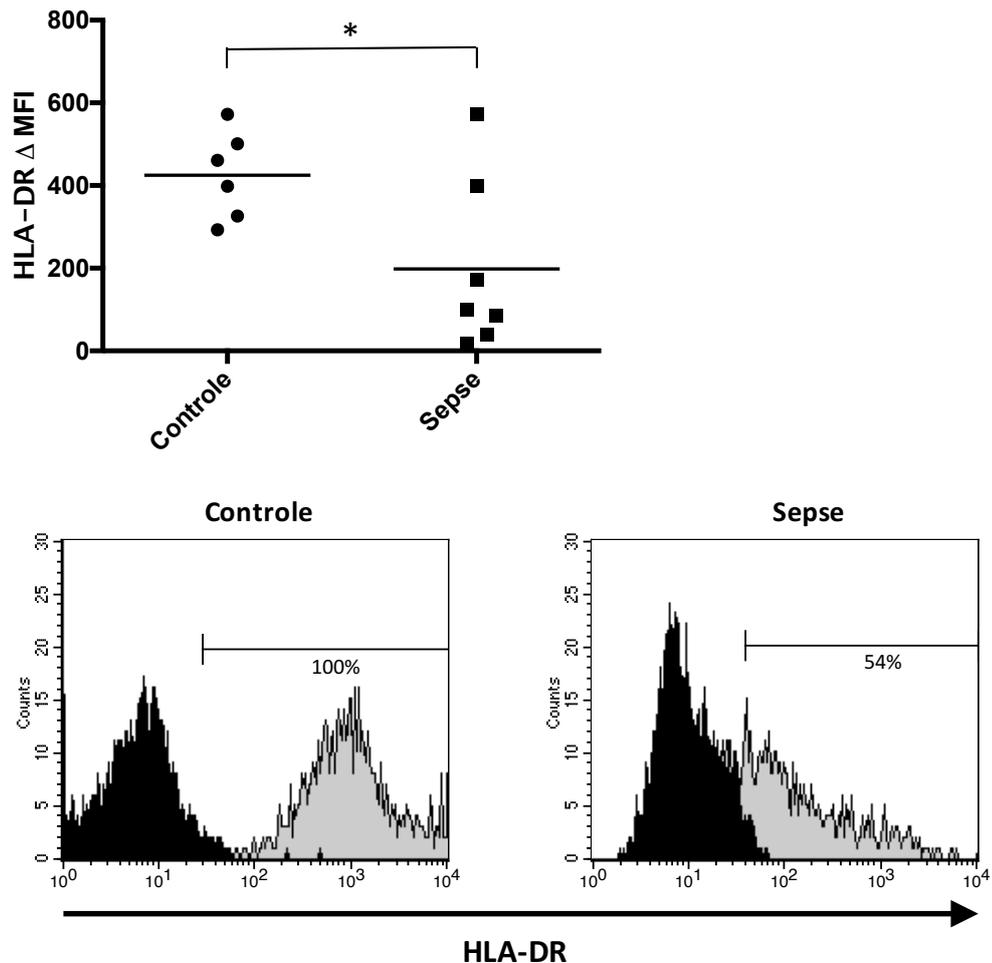


Figura 4.3: Expressão de HLA-DR em pacientes com sepse e controles. Os monócitos (CD14 +, PerCP-Cy5.5) foram analisados por citometria de fluxo para a expressão de HLA-DR (PE) na superfície celular. Acima, as linhas horizontais representam as médias. Abaixo estão demonstrados histogramas representativos dos experimentos, com o percentual de células positivas em relação ao controle isotópico indicado. Δ MFI: mediana da intensidade de fluorescência (MFI) do teste subtraída da MFI do controle isotópico. * $p < 0,05$ (teste T de student).

4.3 Análise proteômica de monócitos de pacientes com sepse

Características dos pacientes

Para estudarmos a composição dinâmica do proteoma dos monócitos na sepse, foram incluídos nove pacientes com sepse e seis voluntários saudáveis (grupo Controle), cujas características estão apresentadas na Tabela 4.1. Nos pacientes, foram realizadas coletas de sangue na fase aguda (grupo Sepse), dentro de 72 horas da internação, e na fase de recuperação da sepse (grupo Recuperação), antes da alta da UTI (média de 12 dias). A idade média dos pacientes foi de 67,7 (\pm 12,3) anos, com predominância do sexo feminino, enquanto que no grupo controle a idade média foi de 67,8 (\pm 4,9) anos e a distribuição dos sexos encontra-se equilibrada. Os sítios de infecção foram distribuídos igualmente entre abdominal, pulmonar e trato urinário (3 pacientes em cada categoria). A gravidade da doença foi medida pelos escores *Simplified Acute Physiologic Score (SAPS 3)* e *Sequential Organ Failure Assessment* e *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)* com valores médios no grupo Sepse de 58,6 (\pm 12,9) e 11,3 (\pm 3,1), respectivamente. No grupo Recuperação, observamos uma redução do SOFA médio para 1,4 (\pm 1,3). Todos os pacientes do grupo Sepse apresentaram choque hemodinâmico, 66% necessitaram de ventilação mecânica e 33% de terapia de substituição renal. O tempo de internação na UTI foi em média de 19,8 (\pm 9,1) dias. Não houve óbitos em 28 dias e apenas um óbito tardio na internação hospitalar.

Características das amostras

O preparo das amostras consistiu no isolamento dos monócitos, seguido da extração das proteínas, digestão trípica e purificação dos peptídeos em microcolunas de fase reversa. Os parâmetros derivados do processamento das amostras e o perfil eletroforético das proteínas estão expostos na Tabela 4.2 e Figura 4.4. Obtivemos um maior número de células e concentração de proteínas no grupo Recuperação. A viabilidade e pureza das células foi semelhante entre os grupos.

Tabela 4.1. Características demográficas, gravidade da doença e desfechos dos pacientes sépticos e controles

	Sepse / Recuperação (N=9)	Controle (N=6)
Idade	67,7 (± 12,3)	67,8 (± 4,9)
Sexo (masculino/feminino)	4/5	3/3
Sítio da infecção:		
- Pulmonar	4	-
- Trato urinário	3	-
- Abdominal	1	-
- Cutâneo	1	-
SAPS 3	58,6 (± 12,9)	-
SOFA (Sepse)	11,3 (± 3,1)	-
SOFA (Recuperação)	1,4 (± 1,3)	-
Ventilação mecânica	6	-
Uso de vasopressores	9	-
Terapia de substituição renal	3	-
Tempo de internação na UTI	19,8 (± 9,1)	-
Mortalidade em 28 dias	0	-
Mortalidade hospitalar	1	-

Variáveis expressas em média ± desvio padrão. SOFA: Sequential Organ Failure Assessment; SAPS: Simplified Acute Physiologic Score

Tabela 4.2: Parâmetros derivados da preparação das amostras

Monócitos	Controle	Sepse	Recuperação
Número ($\times 10^6$)	2,43 ($\pm 1,87$)	2,11 ($\pm 0,27$)	3,62 ($\pm 0,54$)
Viabilidade (%)	96,3 ($\pm 1,22$)	96,66 ($\pm 1,66$)	95,32 ($\pm 0,97$)
Pureza (%)	94 ($\pm 1,28$)	95,15 ($\pm 1,48$)	94,62 ($\pm 1,03$)
Proteínas (mg/ml)	1,41 ($\pm 0,58$)	1,76 ($\pm 0,62$)	1,95 ($\pm 0,52$)
Proteínas (μg)	70,5 ($\pm 29,01$)	87,99 ($\pm 31,21$)	97,56 ($\pm 26,47$)

Variáveis expressas em média \pm desvio padrão.

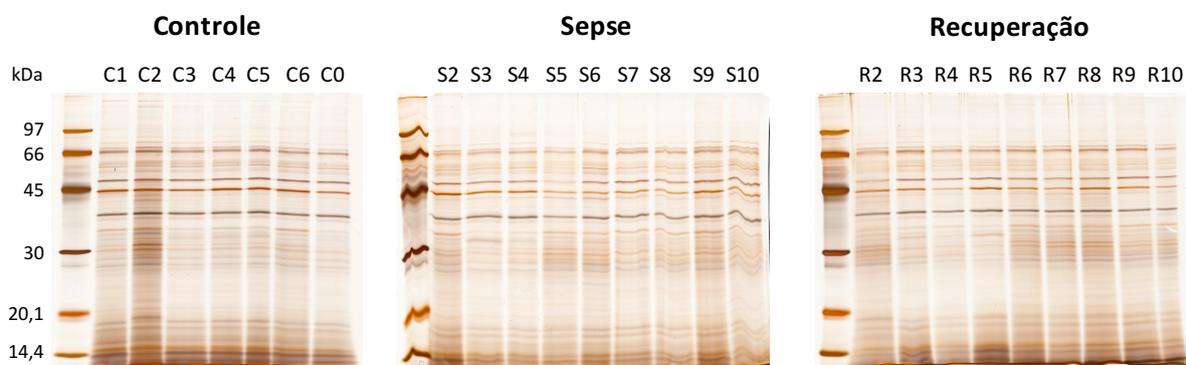


Figura 4.4: Perfil das amostras em SDS-PAGE a 12%. Foram aplicados 5 μg de proteínas por raia e os géis foram revelados por nitrato de prata. Cada raia representa o perfil de um indivíduo.

4.3.1 Proteômica *shotgun*

As análises foram realizadas utilizando plataforma composta por nanocromatografia líquida de fase reversa e ionização por eletrospray acoplada ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-exactive Plus (Figura 3.4). A aquisição das amostras foi obtida através de uma estratégia dependente de dados, constituída por ciclos sucessivos onde os 12 íons precursores mais intensos adquiridos (modo MS) são selecionados para fragmentação seguida de nova aquisição (modo MS/MS, Figura 3.5). Para as análises por espectrometria de massas, as amostras foram divididas em quatro blocos experimentais. No primeiro bloco, todas as amostras foram adquiridas uma única vez e os dados obtidos foram utilizados para uma etapa de normalização das diluições baseada nas correntes iônicas totais das corridas cromatográficas com o objetivo de reduzir a variação do carregamento das amostras nos blocos subsequentes. Os três últimos blocos foram compostos por amostras dos três grupos experimentais, distribuídas em proporções iguais e intercaladas para controlar o efeito potencial de vieses sistemáticos das corridas cromatográficas, e as aquisições foram realizadas em triplicatas técnicas para a caracterização do proteoma.

Utilizando o programa Patternlab for proteomics (151), pudemos identificar, com alto grau de confiança (FDR <1), 40447, 43016 e 48339 peptídeos, com inferência, pelo princípio da máxima parcimônia, de 3467, 3512 e 3735 proteínas nos grupos controle, sepse e recuperação, respectivamente (Tabela 4.3 e Tabela S1). Os grupos experimentais apresentaram 3014 proteínas em comum, sendo 101, 97 e 143 proteínas caracterizadas exclusivamente nos grupos controle, sepse e recuperação, respectivamente (Figura 4.5).

A quantificação relativa das proteínas foi obtida utilizando-se uma metodologia sem marcação, baseada na contagem de espectros de MS/MS (*spectral counting* - SC) (151,162). A análise estatística das diferenças entre os grupos experimentais foi realizada pelo módulo Tfold do Patternlab. O número de proteínas diferencialmente abundantes nas comparações entre os grupos sepse e controle, sepse e recuperação, e controle e recuperação foram de 268, 182 e 202 respectivamente (Figura 4.6 e Tabela S2). O padrão da regulação das proteínas nessas comparações revelou as semelhanças e heterogeneidade entre os indivíduos de cada grupo (Figura 4.7 A). Os grupos Controle e Recuperação são clinicamente distintos, sendo o primeiro composto por voluntários saudáveis e o último, por pacientes que superaram a fase aguda das disfunções orgânicas, mas ainda estão em tratamento da infecção no ambiente hospitalar. Essas diferenças se refletiram no proteoma: o escore MDP

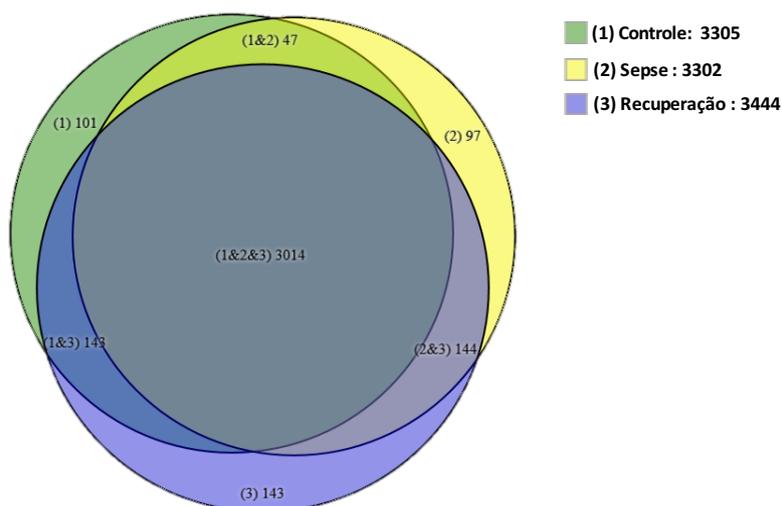
(*molecular degree of perturbation*), que representa numericamente o grau da alteração do proteoma tendo como referência o grupo Controle, demonstrou uma separação clara entre os indivíduos de ambos os grupos Recuperação e Sepse e o grupo Controle. Apesar de haver uma sobreposição individual entre os grupos Sepse e Recuperação, o MDP mediano do grupo sepsis foi significativamente maior (Figura 4.7 B).

A metodologia dependente de dados empregada leva a um viés sistemático a favor da detecção dos peptídeos mais intensos da amostra. Além disso a seleção dos peptídeos (MS) para a identificação (MS/MS) ocorre de forma semi-aleatória dentro dos ciclos de aquisição. Como resultado, em amostras complexas, os valores em falta (*missing values*) são comuns, particularmente os referentes a peptídeos cujos sinais se encontram próximos ao limite de detecção (163). Para as análises das proteínas diferencialmente abundantes, não imputamos valores a esses casos, e conseqüentemente as proteínas inferidas exclusivamente em uma condição biológica não foram analisadas estatisticamente pelo módulo TFold. Entretanto, para as análises de funções biológicas e de interação entre as proteínas, geramos listas que incluíram as proteínas diferencialmente abundantes mais as inferidas exclusivamente em duas ou mais amostras de um grupo, assumindo que estas também representam diferenças de abundância (472 proteínas na comparação entre os grupos Controle e Sepse 421 proteínas na comparação entre os grupos sepsis e recuperação) (164).

Tabela 4.3 Número absoluto de peptídeos identificados e proteínas inferidas nos grupos experimentais.

	SEPro Fusion (FDR combinada)		
	Controle	Sepse	Recuperação
<i>Peptide Spectrum Match (PSM)</i>	283319 (0,4%)	368971 (0,05%)	413482 (0,05%)
Número total de peptídeos	40447 (0,08%)	43016 (0,1%)	48339 (0,11%)
Número de peptídeos únicos	21899	23830	26498
Número total de proteínas	6652 (0,12%)	6618 (0,12%)	7043 (0,17%)
Número de proteínas (máxima parcimônia)	3467	3512	3735
Número de proteínas com pelo menos 1 peptídeo único (proteotípico)	2908	2973	3191

Filtragem estatística e compilação pelo módulo SEPro PatternLab for Proteomics



Total : 3689 proteínas

Figura 4.5: Diagrama de Venn demonstrando o número total, compartilhado e exclusivo de proteínas inferidas nos grupos Controle, Sepse e Recuperação. Somente proteínas presentes em duas ou mais replicatas biológicas e técnicas foram incluídas.

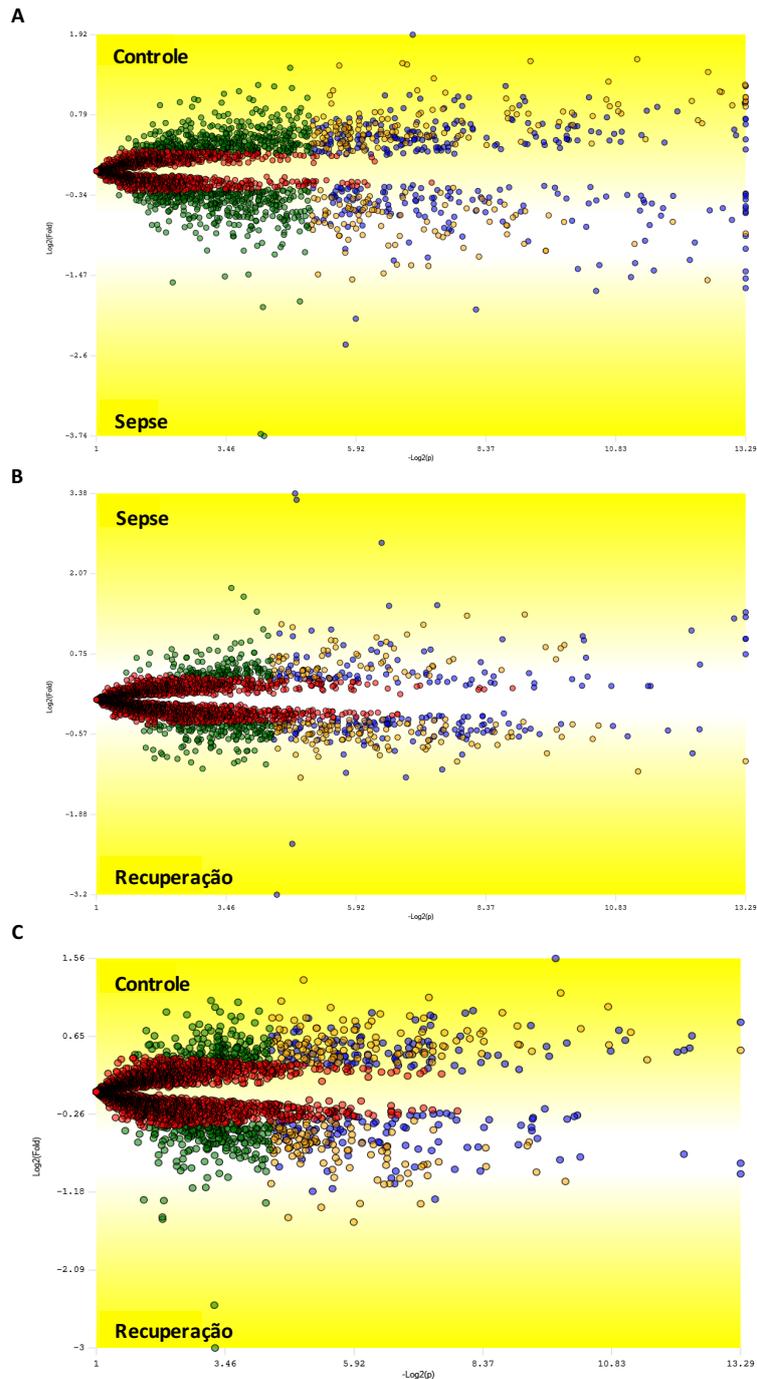


Figura 4.6: Abundância diferencial das proteínas inferidas entre grupos Sepsis e Controle (A), Sepsis e Recuperação (B) e Controle e Recuperação (C). Cada ponto representa uma proteína mapeada de acordo com seu p-valor do teste T no eixo x e a razão da abundância entre os grupos (*fold change*) no eixo y. Os pontos vermelhos indicam proteínas que não satisfazem os critérios de corte estabelecidos para a variação da abundância e o q-valor (0.05). As proteínas assinaladas em verde satisfazem o critério de corte da variação da abundância, mas não o do q-valor. As proteínas identificadas em laranja satisfazem os critérios de corte variação e do q-valor, mas apresentam abundancias baixas. Os pontos azuis representam as proteínas que satisfazem todos os critérios das filtragens estatísticas.

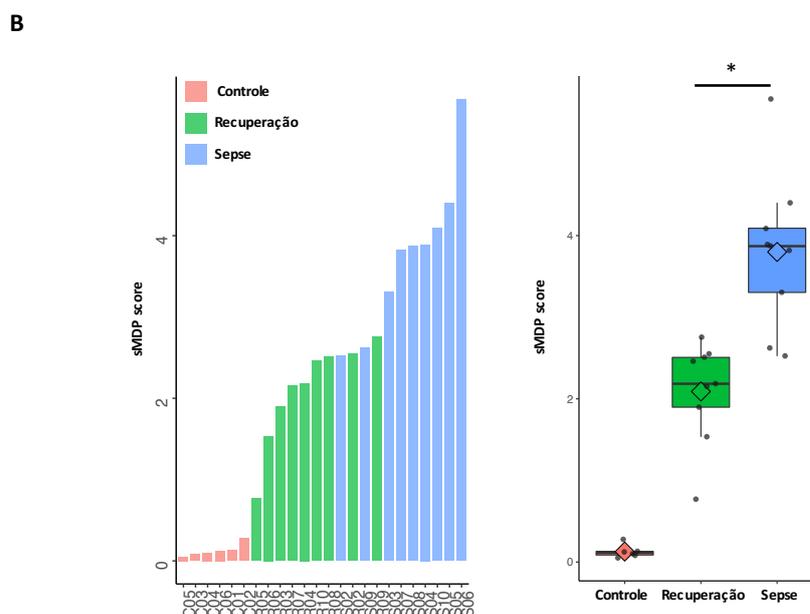
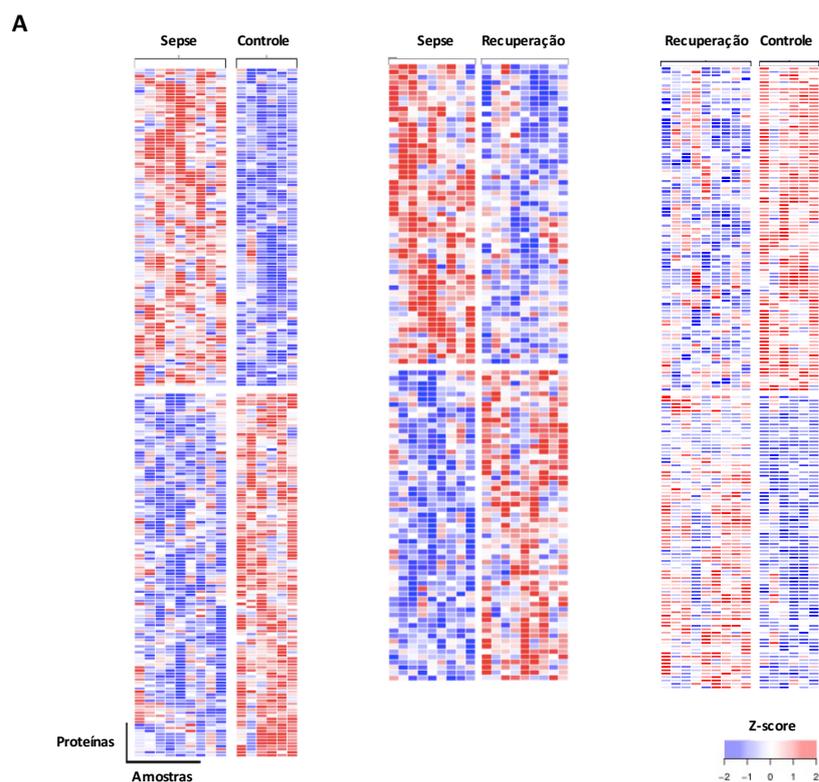


Figura 4.7: Mudanças do proteoma nos grupos experimentais. (A) Padrão das proteínas diferencialmente abundantes inferidas em todas as amostras nas comparações entre os grupos sepsis e controle, sepsis e recuperação e controle e recuperação (191, 116 e 181 proteínas, respectivamente). (B) Escore MDP (*Molecular Degree of Perturbation*) dos grupos sepsis e recuperação em relação ao controle. À esquerda, o histograma representa os valores de cada indivíduo dos grupos em ordem crescente. À direita, gráfico de pontos com valores individuais e a mediana e intervalo interquartil dos grupos. * $p < 0.05$ (teste de Wilcoxon pareado).

Análise de enriquecimento de vias bioquímicas

Utilizamos a plataforma InnateDB (156), com as anotações importadas da base de dados Reactome (157), para explorar as vias bioquímicas estatisticamente super-representadas (*over-representation analysis*) pelas proteínas diferencialmente abundantes nos grupos experimentais (Figura 4.8). Dentre as proteínas mais abundantes no grupo Sepses em relação ao Controle, as vias com maior significância estatística foram relacionadas ao metabolismo glicolítico, incluindo as enzimas canônicas PGK1, ALDOA, ALDOC, GAPDH, PKLR GPI, bem como LDHA, responsável pela conversão do piruvato em lactato em situações onde a fosforilação oxidativa encontra-se reduzida (165). Por outro lado, as proteínas com abundância reduzida na sepsis estão associadas às vias da fosforilação oxidativa e ciclo de Krebs (ATP5C1, DLST, ETFB, NDUFA11, NDUFA2, NDUFS7, NDUFS8, PDK3, PDP1, PDPR, RXRA, SUCLG2, TACO1 e UQCRCQ), beta-oxidação de ácidos graxos (ACADM, DECR1, PCCA, PCCB), e, paralelamente, à via de apresentação de antígenos por MHC de classe II (CD74, CTSH, DCTN3, DYNC1LI2, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DQA2, HLA-DRA, HLA-DRB1, KIF2A, OSBPL1A) e à via relacionada de sinalização por interferon (EIF2AK2, EIF4A3, EIF4E2, HLA-DPA1, HLA-DQA2, HLA-DRA, HLA-DRB1, IFIT1, MX1, NUP35, OAS3, PSMB8, UBE2L6). A análise das proteínas positivamente reguladas no grupo Recuperação em relação ao grupo Sepses revelaram uma elevada representação de proteínas associadas à sinalização por citocinas (CASP1, CRK, DDX58, EIF2AK2, EIF4E, GBP4, GBP5, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, ICAM1, IFIT1, IFIT3, IL1RN, MAP2K6, MAPK1, MX1, OAS3, PTPN6, RNASEL, SHC1, SQSTM1, STAT1, UBE2L6, YWHAB), destacando-se a via do interferon (GBP4, GBP5, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, ICAM1, OAS3, PTPN6) e da apresentação de antígenos por MHC de classe II (AP2B1, CD74, DCTN3, DYNC1LI2, HLA-DMA, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, KIF2A).

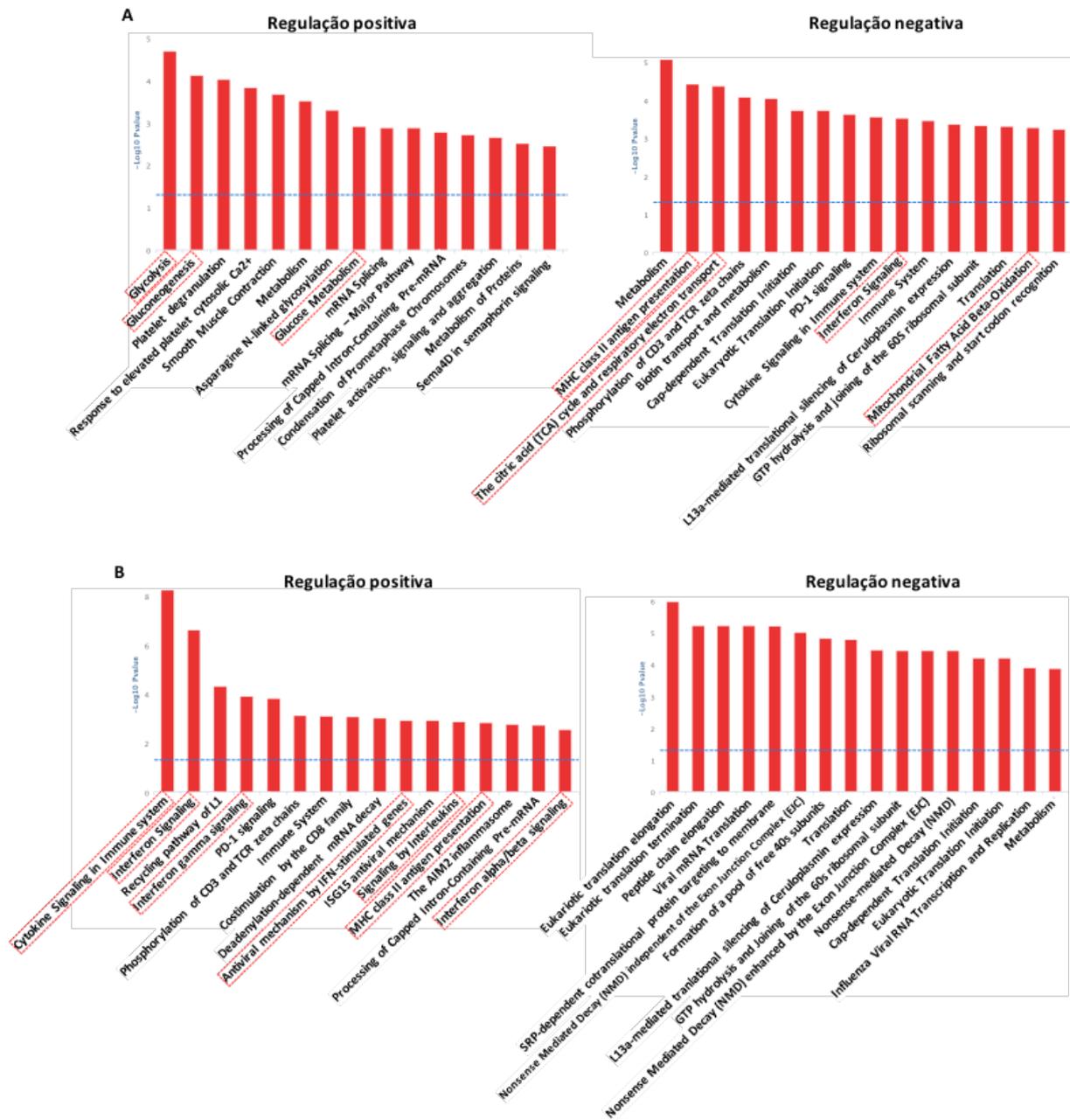


Figura 4.8: Vias super-representadas dentre as proteínas diferencialmente abundantes nos grupos (A) Sepse, em relação ao Controle e (B) Recuperação em relação ao Sepse. A análise de super-representação foi realizada na plataforma InnateDB a partir das vias anotadas do banco de dados Reactome. O eixo y representa o $-\log_{10}$ do p-valor para a associação entre as vias e o conjunto de proteínas reguladas positivamente ou negativamente nos grupos. Significância definida como $P \geq 0,05$ (correção pelo método de Benjamini & Hochberg).

Análise de redes de proteínas

Para ampliarmos o entendimento das relações entre as proteínas diferencialmente abundantes nos grupos, utilizamos o aplicativo *Proteomics Standard Initiative Common QUery InterfaCe* (PSICQUIC), dentro do programa Cytoscape (158), para construir uma rede de interações validadas experimentalmente entre proteínas a partir do InnateDB. As 356 e 377 proteínas reguladas positivamente entre os grupos Sepse e Controle e Recuperação e Sepse, resultaram em duas redes de 4755 nós (*nodes*) com 11.851 ligações (*edges*) e 5054 nós com 12705 ligações, respectivamente (Figura 4.9). Em seguida, identificamos 20 proteínas centrais das redes mais pontuadas pelo critério da Centralidade do Clique Máximo (*Maximum Clique Centrality – MCC*), calculado pelo aplicativo CytoHubba (159). No grupo Sepse, 4 dos 20 nós centrais são enzimas relacionadas à glicólise (ALDOA, GAPDH, LDHA, PGK1), estando também representadas proteínas envolvidas com a resposta celular ao estresse (HSP90AA1, HSP90AB1, MDM2, RB1) e o splicing de mRNA (FUS, HNRNPK, HNRNPL, PCBP2). No grupo Recuperação, podemos destacar STAT1 e MAPK1, importantes reguladores da imunidade inata, e proteínas relacionadas à sua atividade (CRK, SHC1, SQSTM1, UBC, YWHAB).

Perfil imunometabólico dos grupos experimentais

A partir das análises de enriquecimento de vias e das redes de interação, selecionamos as proteínas com alta cobertura (>90%) dentre os grupos experimentais e especificamente relacionadas às vias de interesse do metabolismo energético e resposta imune. Dentre as proteínas da glicólise, a glicose-6-fosfato isomerase (GPI), aldolase (ALDOA, ALDOC), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDHS), fosfoglicerato-quinase (PGK1), e piruvato quinase (PKLR) estão envolvidas na cadeia principal de reações da conversão da glicose ao piruvato (etapas 2, 4, 6 e 7, e 10 respectivamente). A lactato desidrogenase (LDHA) catalisa a interconversão entre piruvato e lactato. Do ciclo do ácido cítrico, a dihidrolipoil succiniltransferase (DLST) é um componente do complexo da α -cetoglutarato-desidrogenase que oxida o α -cetoglutarato a succinil-CoA e CO₂. Em sequência, a conversão de succinil-CoA a succinato é catalisada pela succinil-CoA ligase (SUCLG2). Da fosforilação oxidativa, a flavoproteína transportadora de elétrons (ETFB) transfere elétrons de desidrogenases mitocondriais para a cadeia transportadora de elétrons, que produz um gradiente eletroquímico utilizado pela ATP sintase mitocondrial (ATP5C1) para catalisar a síntese de ATP. Das proteínas envolvidas na resposta inflamatória,

o fator ativador de transcrição de sinal e transdutor de ativação-1 (STAT1) é um mediador da sinalização intracelular dos interferons e a proteíno-quinase ativada por mitógenos-1 (MAPK1) participa da regulação da transcrição ativada por fatores de crescimento e citocinas. O antígeno leucocitário humano-DR (HLA-DRA) é uma molécula de apresentação de antígenos derivados de proteínas extracelulares (MHC classe II). A cadeia invariante do MHC de classe II (CD74) participa da estabilização e transporte celular dessas moléculas.

A partir do padrão de abundância dessas proteínas, realizamos uma análise de agrupamento hierárquico (*hierarchical clustering*), que foi capaz de separar completamente os indivíduos dos Grupos Controle e Sepse. O grupo Recuperação, exceto por um indivíduo, foi agrupado junto ao Controle. De forma semelhante, as proteínas da resposta imune, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa foram agrupadas conjuntamente, separadamente das relacionadas à glicólise (Figura 4.10 A). No grupo Sepse, em relação ao Controle, as proteínas da glicólise apresentaram uma regulação positiva, enquanto que as da inflamação, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa foram negativamente reguladas. Essas diferenças foram em grande parte revertidas no grupo recuperação (Figura 4.10 A e B). A maior parte das diferenças de abundância entre os grupos recuperação e controle não foi estatisticamente significativa.

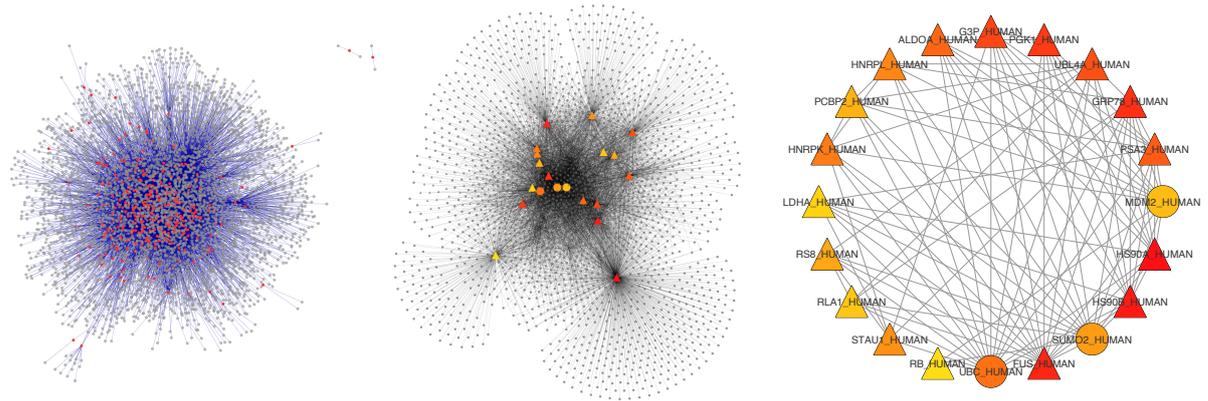
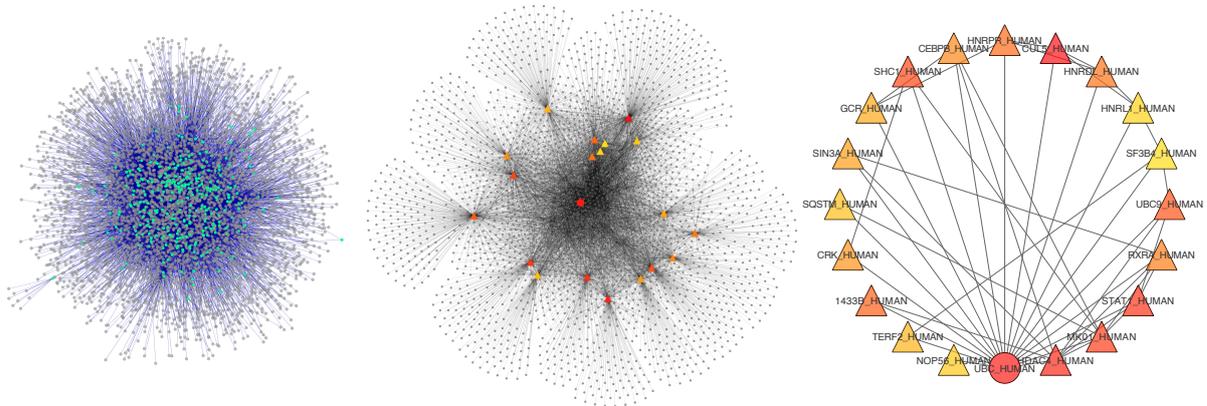
A**B**

Figura 4.9: Análise topológica da rede de interações das proteínas positivamente reguladas nos grupos (A) Sepse, em relação ao Controle e (B) Recuperação em relação ao Sepse. As redes de interações derivadas da plataforma innateDB foram visualizadas no programa Cytoscape. À esquerda: As proteínas diferente abundantes representam os nodos vermelhos e verdes nos grupos sepse e controle, respectivamente. Centro e direita: As 20 proteínas mais pontuadas pelo critério de centralidade dos cliques máximos (MCC), utilizando o aplicativo CytoHubba, apresentadas com as suas interações de primeiro grau (centro) e entre si (direita). Os nodos, representados na escala de vermelho (pontuação mais elevada) a amarelo (pontuação menos elevada), correspondem às proteínas HS90A, HS90B, FUS, GRP78, PGK1, G3P, UBL4A, PSA3, ALDOA, UBC, HNRPK, HNRPL, STAU1, SUMO2, RS8, PCBP2, MDM2, RLA1, LDHA e RB no grupo sepse e CUL5, UBC, HDAC4, STAT1, MKO1, SHC1, UBC9, 1433B, HNRPR, HNRDL, RXRA, CEBPB, CRK, SIN3A, GCR, TERF2, SQSTM, NOP56, HNRPL, SF3B4 no grupo Recuperação. Os nodos triangulares representam proteínas inferidas do experimento e os circulares, as acrescentados pela rede do InnateDB.

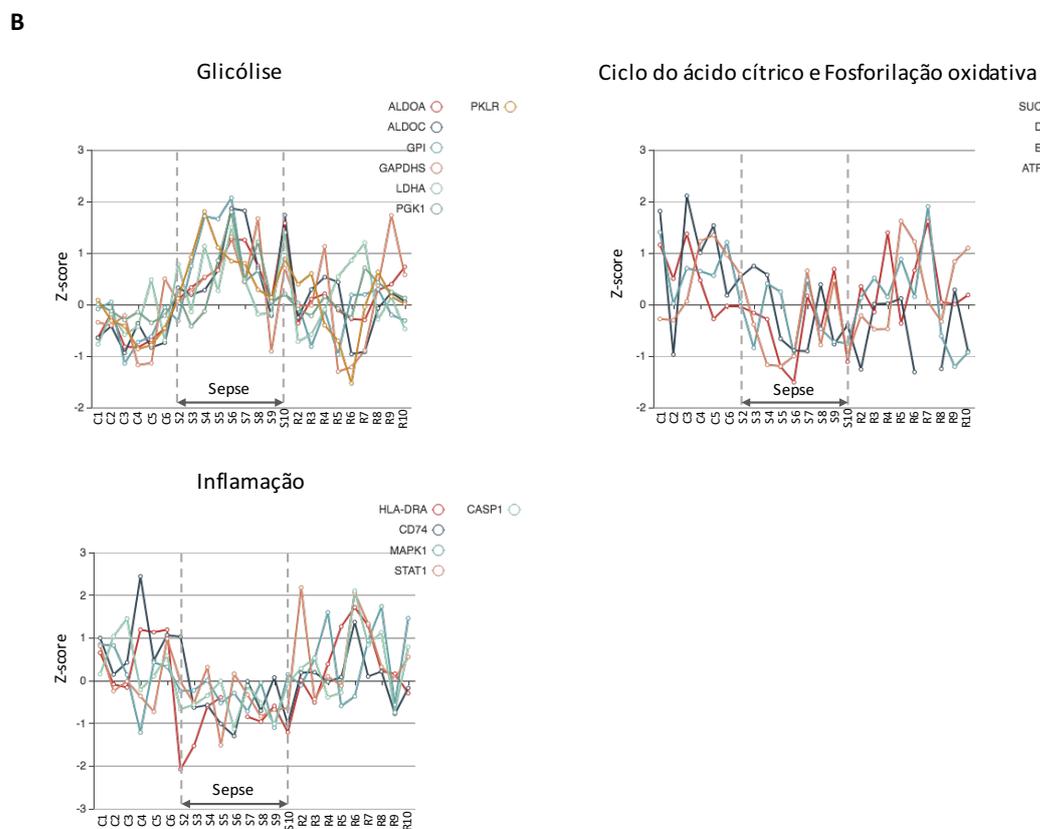
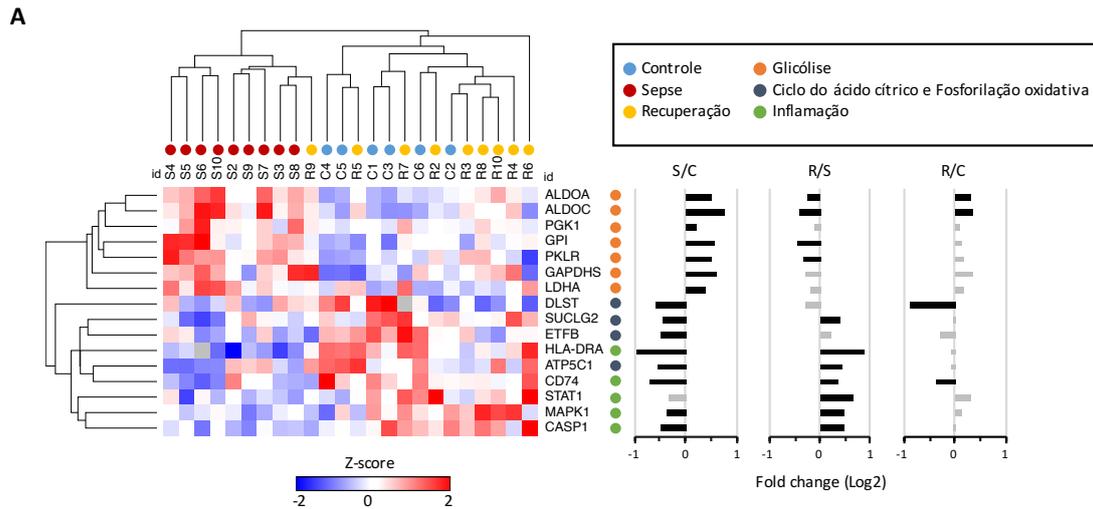


Figura 4.10: Perfil imunometabólico dos grupos experimentais. (A) À esquerda, as colunas (indivíduos) e linhas (proteínas) foram agrupadas hierarquicamente (*hierachical clustering*) pela distância Euclidiana. Os valores de abundância estão normalizados pelo z-score de cada linha. À direita, estão representadas as razões das abundâncias (NSAF) das proteínas (*fold changes*) entre os grupos controle (C), Sepse (S) e Recuperação (R). As barras cinzas representam diferenças estatisticamente não-significativas (TFold). (B) Z-scores das proteínas separadas pelas vias bioquímicas. As amostras estão organizadas pelo identificador dos indivíduos do grupo Controle (C1 a C6) seguido dos grupos Sepse (S2 a S10) e Recuperação (R2 a R10).

4.3.2 Proteômica dirigida

Com o objetivo de analisarmos de forma mais acurada e seletiva as alterações do metabolismo energético observadas na sepse pela proteômica *shotgun*, desenvolvemos um ensaio de proteômica dirigida pela técnica de monitoramento de reação selecionada (*selected reaction monitoring* - SRM). Para tal, selecionamos 85 proteínas envolvidas nas vias da glicólise, beta-oxidação, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa, das quais foram escolhidas as 2 ou 3 transições (par do peptídeo precursor e um fragmento) com as melhores detecções no experimento de proteômica *shotgun* (Tabela S3). Em seguida, procuramos validar essas transições utilizando uma amostra de teste (pool das amostras clínicas) no sistema de LC-MS empregado no ensaio de SRM. Devido às diferenças da fragmentação entre os espectrômetros utilizados no experimento de proteômica *shotgun* e SRM, somente 110 das 564 transições da lista inicial foram detectadas. Para complementarmos essas identificações, adicionamos 255 transições derivadas de bancos de espectros experimentais publicados no repositório público SRM Atlas (<http://www.srmatlas.org>). Após novas corridas de validação e refinamento, obtivemos um método final com 330 transições experimentalmente verificadas, referentes a 63 proteínas. A partir dos tempos de retenção obtidos, ajustamos a janela para o agendamento (programação do momento da cromatografia onde uma determinada transição será monitorada) de forma a permitir a obtenção de pelo menos 12 pontos por precursor em cada cromatograma (figura 4.11 A).

Em seguida, procedemos com a análise grupos experimentais, utilizando as mesmas amostras preparadas para o experimento de proteômica *shotgun*. Como empregamos uma metodologia sem o uso de peptídeos de referência marcados (*label free*), a confirmação das identidades dos peptídeos foi baseada na concordância da coeluição e formato do pico das transições, correspondência das intensidades relativas dos fragmentos com a biblioteca espectral e consistência no tempo de retenção entre as amostras (166). De acordo com esses critérios, e com a boa resolução cromatográfica obtida, conseguimos identificar com confiança 273 transições referentes a 63 proteínas nas amostras dos grupos experimentais (Figura 4.11 B). Apesar dos tempos de retenção terem permanecido relativamente constantes, deslocamentos ocorreram e são esperados, devido a uma combinação de variações técnicas, já que as aquisições ocorrem ao longo de vários dias, e biológicas. Portanto, o monitoramento periódico e pequenos ajustes no agendamento foram

necessários para que os picos não fossem truncados ou perdidos (Figura 4.11 C). A ordem de aquisição das amostras foi randomizada, de forma a evitar vieses sistemáticos decorrentes de oscilações técnicas na cromatografia. Na etapa de controle de qualidade dos resultados, verificamos elevados coeficientes de variação (CV) entre as replicatas técnicas, com aproximadamente 30% das transições com $CV < 10\%$ (Figura 4.12). Como o experimento foi realizado em duplicatas técnicas, não pudemos apontar e excluir uma replicata discrepante das demais. Ao filtrarmos as transições com CV elevado, a representatividade dos peptídeos nos grupos experimentais tornou-se muito baixa e não foi possível, portanto, procedermos com a quantificação diferencial.

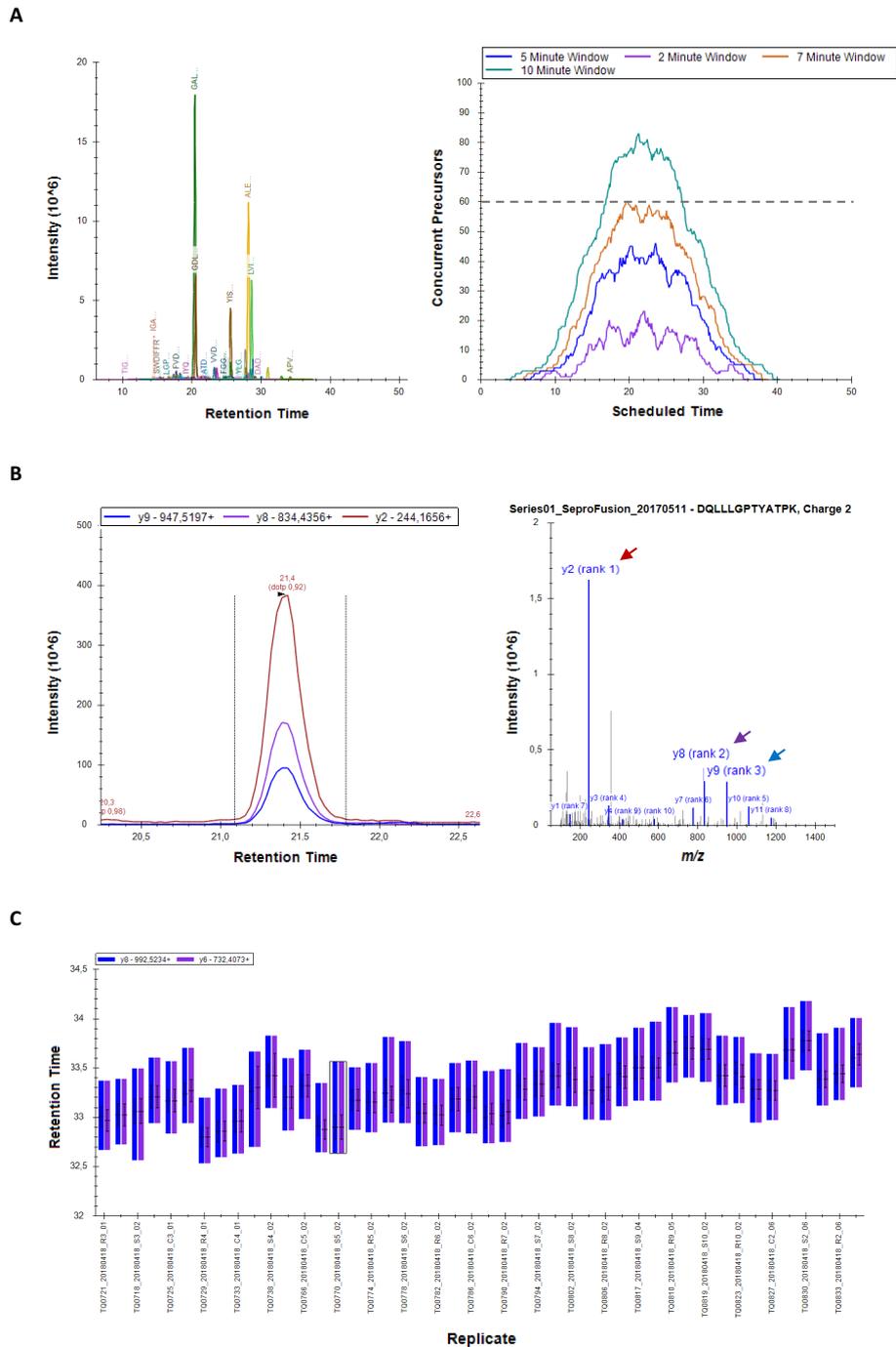


Figura 4.11: Monitoramento dos peptídeos no ensaio de SRM. (A) À direita: cromatograma de todos os peptídeos monitorados. À esquerda: estimativa do número de precursores que coeluem na cromatografia, de acordo com diferentes janelas de monitoramento de tempo de retenção. A linha tracejada indica o número máximo para a janela de 7 minutos (curva laranja), utilizada no experimento. (B) À direita: Cromatograma referente a um peptídeo, monitorado através de 3 transições. À esquerda: espectro correspondente ao peptídeo na biblioteca, com os fragmentos monitorados assinalados por setas. (C) Tempos de retenção referentes a um peptídeo nas corridas de todas as amostras, organizadas pela ordem de aquisição.

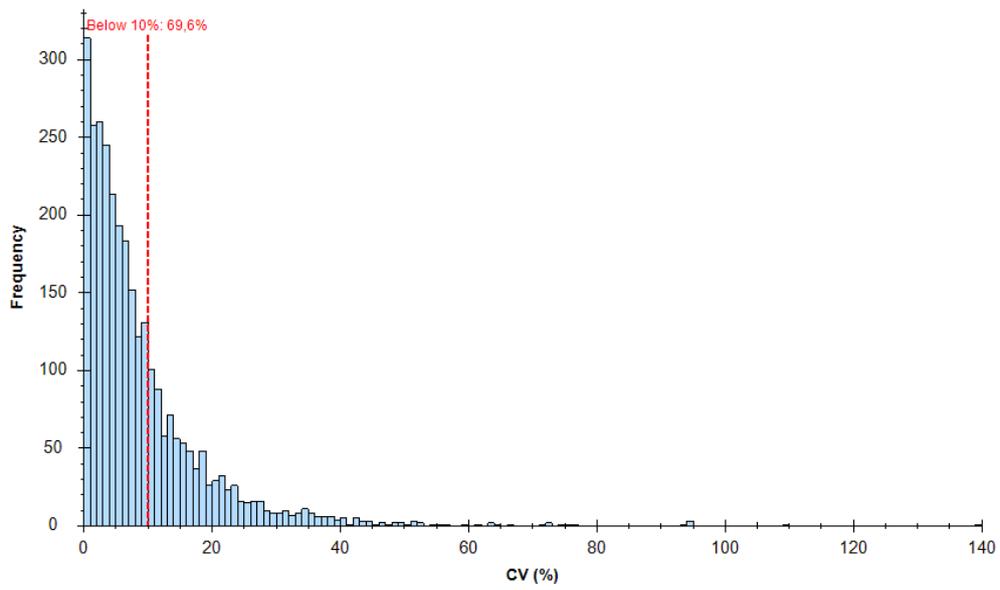


Figura 4.12: Variabilidade técnica nas aquisições. O histograma demonstra as frequências dos coeficientes de variação (CV) entre as replicatas técnicas de todas as transições das amostras. A linha tracejada marca o CV de 10%.

5 Discussão

A associação entre alterações primárias do metabolismo celular e o surgimento de disfunções orgânicas na sepse vem sendo um tópico de interesse há muitos anos. A partir de um conjunto de evidências de modelos experimentais e estudos clínicos, Fink propôs, na década de 1990, o termo “hipóxia citopática” para definir a deficiência na produção de ATP celular a despeito da presença de níveis de oxigênio normais no ambiente tecidual (167). Esse fenômeno distinguiria o choque séptico daquele causado, por exemplo, pela hemorragia ou redução do débito cardíaco, onde a diminuição da oferta de oxigênio é o mecanismo proeminente. Apesar de ter sido incorporada à estrutura conceitual da fisiopatologia da sepse ao lado da SIRS, o número de publicações que buscaram associar a hipóxia citopática à disfunção imunológica da sepse é surpreendentemente escasso. Um estudo pioneiro foi o de Japiassu e colaboradores. Utilizando ensaios de respirometria, que envolveram a mensuração do consumo de oxigênio mediante à indução de diferentes estados respiratórios por substratos e inibidores da fosforilação oxidativa, os autores demonstraram em PBMCs isoladas de pacientes com choque séptico uma redução na respiração mitocondrial devida à inibição da atividade da enzima ATP sintase (103).

Um desenvolvimento paralelo, e mais recente, foi a integração entre os campos da imunologia e metabolismo, tradicionalmente estudados separadamente, para a caracterização de mecanismos “imunometabólicos” específicos, envolvidos na transição de estados quiescentes a ativados em leucócitos. Um dos achados mais notáveis desses estudos foi que as células que utilizam primariamente a fosforilação oxidativa para gerar a energia necessária aos processos celulares no estado basal, como os linfócitos e macrófagos, tipicamente, quando ativadas, passam a depender da glicólise como a principal fonte de ATP, o que é acompanhado de uma supressão da respiração mitocondrial (168).

Esta aparente dicotomia entre a “disfunção bioenergética” de leucócitos na sepse e as adaptações metabólicas que são necessárias para a composição da resposta inflamatória à infecção forma a base das questões exploradas nesta tese. Neste capítulo, abordaremos a relevância, limitações e perspectivas dos resultados obtidos a partir desta linha de investigação.

5.1 Ensaios de ativação *in vitro* e *ex vivo*

O primeiro conjunto de experimentos que realizamos *in vitro*, buscou replicar a transição para a glicólise aeróbia em macrófagos após a ativação clássica com LPS, que havia sido reportada, até então, em poucos estudos. A Figura 5.1 demonstra a rápida ascensão do campo do imunometabolismo no período do desenvolvimento da tese, iniciado em 2014. Às descrições iniciais, por Newthorne e colaboradores na década de 1980, do aumento do metabolismo da glicose em macrófagos murinos ativados por tioglicolato, seguiu-se um longo intervalo onde o tema recebeu pouca atenção da comunidade científica (169,170). No ano de 2008, a partir de experimentos de fluxo metabólico utilizando glicose isotopicamente marcada, Rodríguez-Prados e colaboradores demonstraram a reprogramação distinta do metabolismo energético que ocorre entre as ativações M1 e M2 (84). O interesse mais específico do estudo desse fenômeno na sepse foi impulsionado pela publicação de Cheng e colaboradores, em 2014, que descreveu a glicólise aeróbia como a base metabólica para a indução do fenótipo de *trained immunity* em monócitos, associado à redução a mortalidade da sepse experimental por injeção de *S. aureus* em camundongos (171).

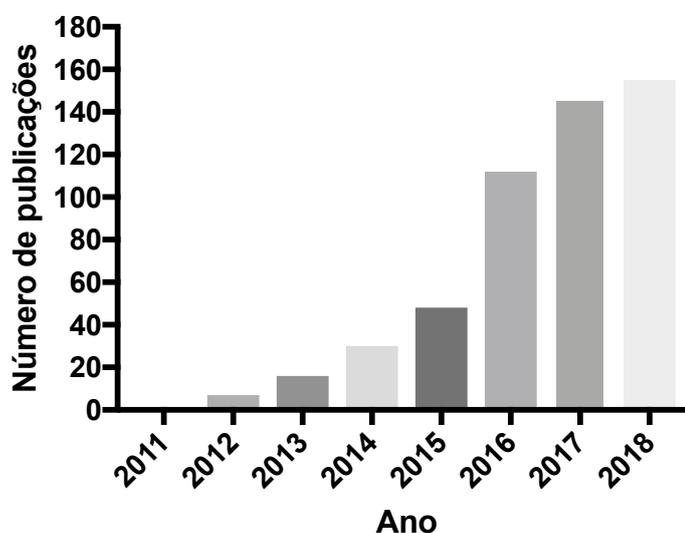


Figura 5.1: Número anual de publicações até 20/09/2018 pelo termo de busca “immunometabolism” na base MEDLINE.

À essa época, o papel do fator induzido pela hipóxia (HIF)-1 na regulação da glicólise aeróbia nas células do sistema monocítico-fagocitário também já se encontrava bem estabelecido. O HIF-1 é um fator de transcrição envolvido na expressão de genes que regulam a adaptação celular ao estresse. Sua ativação inicialmente foi descrita em resposta à hipóxia, mas recentemente demonstrou-se que sua atividade aumenta em função de

estímulos inflamatórios como o LPS. No estado quiescente, as células degradam o HIF-1 através da ação de prolil-hidroxilases (PHD) dependentes de oxigênio e ferro, que degradam a molécula pela via da ubiquitina-proteassoma. Adicionalmente, uma asparaginil-hidroxilase (FIH) atua inibindo a atividade transcricional do HIF-1. Em situações de privação de oxigênio e ferro, a atividade das PDH e FIH é inibida e o HIF atua regulando a ativação de genes que promovem o aumento da glicólise e redução da fosforilação oxidativa (168). O reconhecimento de patógenos através dos TLR também é um potente estímulo indutor de HIF-1. Em células dendríticas, Jantsch e colaboradores demonstraram que a combinação de hipóxia e LPS promove sinergicamente o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias, MHC de classe II e secreção de citocinas pró-inflamatórias, paralelamente a um aumento da atividade glicolítica e dos níveis proteicos de HIF-1 (172). Por outro lado, o *knockdown* de HIF-1 inibiu a maturação e a capacidade das células dendríticas de induzirem a proliferação de células T, bem como na expressão da enzima glicolítica fosfoglicerato quinase e do receptor de captação de glicose GLUT-1. Outra observação interessante desse estudo foi que o tratamento com um metabólito inibidor da glicólise provocou a inibição da expressão de moléculas coestimulatórias, mesmo em condições de normoxia, o que indica a dependência do metabolismo glicolítico para a ativação inflamatória nessas células.

Em nossos experimentos, demonstramos que a transição para a glicólise após o estímulo com LPS ocorre de forma análoga na linhagem de macrófagos murinos RAW e em monócitos humanos isolados do sangue de voluntários saudáveis. Um objetivo técnico importante para nós nessa etapa do desenvolvimento do projeto foi a seleção e padronização de ensaios tendo em vista a aplicabilidade em amostras clínicas, sendo a principal limitação a quantidade de células disponíveis para as análises. Os protocolos mais comumente empregados para o isolamento de monócitos do sangue com alta pureza requerem a separação por gradiente de densidade e seleção imunomagnética, o que resulta em perdas celulares substanciais a cada etapa. Conforme demonstrado na Tabela 4.2, pudemos obter em torno de 2.5×10^6 monócitos utilizando essas técnicas a partir de uma alíquota de 20 ml de sangue total. Essa quantidade de células é inferior à utilizada, por exemplo, nos experimentos de respirometria do estudo de Japiassu e colaboradores. Alternativamente, nós acessamos a dependência da fosforilação oxidativa pela mensuração relativa do ATP celular antes e após a inibição da cadeia transportadora de elétrons pela antimicina A, utilizando um total de $2,7 \times 10^5$ células (incluindo as replicatas técnicas). Além

disso, verificamos que é possível realizar o ensaio em amostras congeladas, o que permite o acúmulo para a análise em lote (Figura 5.2). De forma semelhante, o acúmulo de lactato no meio extracelular também pode ser mensurado após a incubação de quantidades reduzidas de células em microplacas. A marcação combinada com anti-CD14 para o janelamento dos monócitos permite que os ensaios de citometria para mensuração de moléculas de superfície celular, como o HLA-DR e GLUT-1, e da captação do análogo fluorescente da glicose 2-NBDG sejam realizados diretamente em alíquotas de sangue total ou PBMCs, aumentando o aproveitamento das amostras.

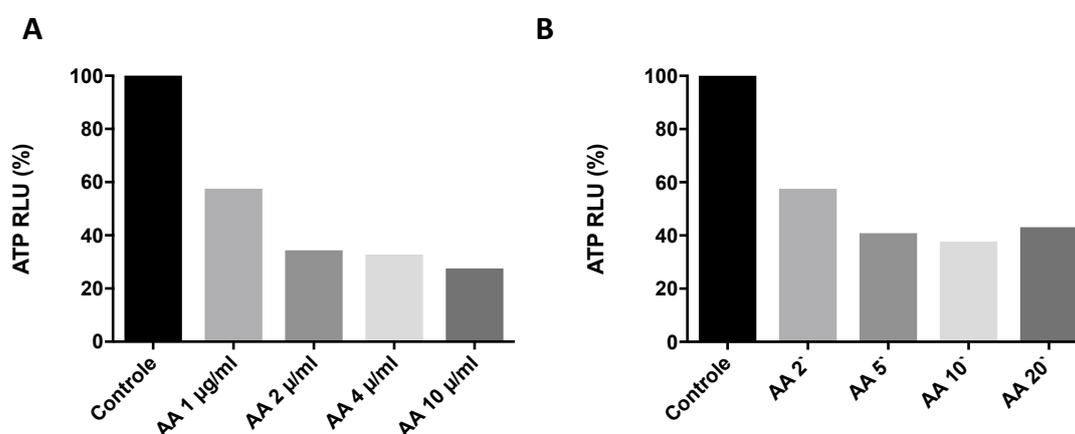


Figura 5.2. Quantidade de ATP celular em monócitos expostos a diferentes concentrações de antimicina A (AA) por 2 minutos (A) e a 2 µ/ml de antimicina A por diferentes intervalos de tempo. Após os tratamentos as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20C até a quantificação do ATP. Cada barra representa 1 poço com 4.5×10^5 células.

Finalmente, partindo da premissa de que o metabolismo celular está intimamente relacionado ao processo de ativação inflamatória, gostaríamos de expor algumas observações que julgamos relevantes, relacionadas aos protocolos comumente utilizados em experimentos *in vitro*. Tipicamente, os experimentos com modelos de culturas de células envolvem a incubação em um ambiente com a temperatura e o nível de dióxido de carbono controlados, com o objetivo de simular o ambiente tecidual (173). No entanto, as células geralmente permanecem expostas a tensões de oxigênio próximas às atmosféricas, o que não corresponde aos níveis fisiológicos. Em humanos, à medida em que o oxigênio é transportado dos alvéolos pulmonares para os tecidos, suas tensões sofrem um decréscimo progressivo, podendo chegar a menos de um décimo dos valores iniciais (174,175). Esses níveis excessivos de oxigênio podem introduzir, portanto, um viés sistemático nos efeitos observados por alterar, por exemplo, a ativação de HIF-1 ou induzir a formação de ROS. De

forma semelhante, as concentrações de glicose as quais as células são expostas também requerem um monitoramento cuidadoso. Um conjunto crescente de evidências vem demonstrando que a exposição a níveis de glicose correspondentes à hiperglicemia pode induzir a ativação inflamatória de células do sistema monocítico fagocitário (176,177). As concentrações de glicose nas formulações-padrão dos meios de cultura mais utilizados em experimentos com essas células, como RPMI-1640 (11 mM) ou DMEM *high glucose* (25 mM) são consideravelmente superiores aos níveis fisiológicos (por exemplo, < 5.6 mM é a referência para a glicemia em jejum) (178). Outro modelo tradicionalmente empregado para a avaliação da produção de citocinas em monócitos é o estímulo *ex vivo* de sangue total com LPS, que apresenta as vantagens teóricas de minimizar a manipulação e manter as células em seu ambiente natural (179). No entanto, em experimentos exploratórios, nós observamos uma rápida queda da concentração de glicose, acompanhada de um aumento da concentração de lactato em amostras de sangue total incubadas a 37°C, que presumimos estar relacionada principalmente à alta densidade de hemácias, células exclusivamente glicolíticas (Figura 5.3). Além da interferência provocada pela inibição da glicólise sobre a ativação inflamatória, que nesse caso poderia ocorrer pela restrição de substrato, já foi demonstrado que a incubação com lactato ou a acidificação do meio é capaz de suprimir a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a glicólise em culturas de monócitos (180).

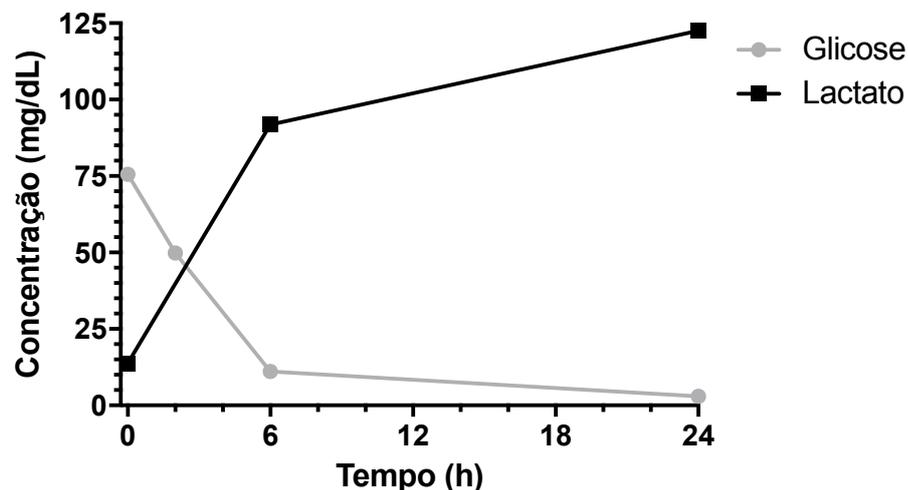


Figura 5.3: Concentrações seriadas de glicose e lactato em uma alíquota de 3 ml sangue total incubado a 37°C.

5.2 Expressão de HLA-DR em monócitos de pacientes

Atualmente, a redução da expressão de HLA-DR na superfície de monócitos circulantes é o biomarcador mais bem caracterizado e reconhecido de disfunção imunológica em doentes críticos. Do ponto de vista clínico, essa associação é baseada principalmente nas descrições do aumento do risco de complicações infecciosas em condições que se encaixam no paradigma da SIRS/CARS, como a sepse, pancreatite, pós-operatório cirurgias de grande porte, politrauma e queimaduras (101,181–183). Adicionalmente, na sepse, a baixa expressão sustentada de HLA-DR monocítica é um preditor de mortalidade (102). O fundamento biológico também é aparentemente direto: como uma das principais moléculas de apresentação de antígenos, o HLA-DR é necessário para a ativação e manutenção da resposta imune adaptativa (184). Além disso, demonstrou-se que os monócitos com baixa expressão de HLA-DR apresentam uma redução na secreção de citocinas pró-inflamatórias quando estimulados com LPS, o que motivou a proposição do termo “imunoparalisia” por Volk e colaboradores na década de 1990 para caracterizar esse fenômeno (185). A principal aplicação desse ensaio no presente é a estratificação de pacientes em estudos de fisiopatologia ou de terapias imunoadjuvantes experimentais.

Em nossos estudos de citometria de fluxo, observamos predominantemente uma redução da expressão de HLA-DR em monócitos associada à sepse, com poucos pacientes apresentando níveis semelhantes aos controles. Esse padrão é concordante com o usualmente reportado em populações de UTIs mistas de hospitais gerais (101,102), e sugere que a nossa coorte tende à imunossupressão em um momento precoce da internação, dentro do espectro do desequilíbrio imunológico da sepse.

5.3 Estudos proteômicos

Durante o processo de padronização dos experimentos utilizando técnicas tradicionais de biologia celular, chegamos a um conjunto de ensaios que, apesar de aplicáveis às amostras clínicas disponíveis, demandariam uma logística complexa de processamento paralelo na bancada após cada coleta, o que poderia gerar uma variabilidade experimental adicional em amostras clínicas já sabidamente heterogêneas. Além disso, compõem um desenho experimental em que não há margem para a exploração de fenômenos fora de hipóteses pré-definidas, o que acreditamos ser uma limitação importante para o estudo da sepse clínica, cuja fisiopatologia ainda é baseada em concepções que são em grande parte especulativas. Considerando esses aspectos técnicos e conceituais, julgamos que uma

abordagem mais adequada para as questões propostas no presente estudo poderia ser atingida através de experimentos exploratórios e dirigidos de proteômica.

Atualmente, as tecnologias ômicas tem um papel consolidado dentre as ferramentas empregadas na pesquisa translacional. Na sepse clínica, conforme já exposto na Seção 1.4 a maior parte dos estudos buscou a caracterização de biomarcadores relacionados à síndrome. Como tal, buscaram primariamente moléculas que apresentam uma associação reprodutível com o diagnóstico ou desfechos clínicos. Nesses estudos, as inferências a respeito da biologia da doença frequentemente são pobres ou ausentes, o que contrasta com o objetivo da nossa investigação. Por exemplo, um painel molecular, recentemente aprovado para o uso clínico nos EUA para a diferenciação entre a sepse e a inflamação sistêmica estéril, é baseado nos níveis de expressão de quatro genes no sangue total. Apesar de individualmente relacionados à resposta do hospedeiro à infecção, não houve uma tentativa pelos autores dos estudos de validação de propor um papel biológico coerente mais específico para esse conjunto de moléculas na sepse (186). No caso da proteômica, esse tipo de abordagem experimental, partindo da análise do plasma de pacientes com sepse, foi empregada em quase todas as publicações até o momento (Tabela 1.6).

Existe, no entanto, um número crescente de estudos que empregaram tecnologias ômicas para ampliar a compreensão dos mecanismos patológicos da sepse clínica, inclusive relacionados à nossa linha de investigação. De forma semelhante ao nosso protocolo experimental, Shalova e colaboradores estudaram o transcriptoma de monócitos de pacientes com sepse na fase aguda e de recuperação (113). Nessa coorte, os autores observaram uma regulação positiva de genes relacionados à resposta inflamatória na fase aguda da sepse, com um aumento concordante da expressão de HIF-1. Curiosamente, essas células foram hiporresponsivas ao estímulo *ex vivo* com LPS, o que foi revertido na fase de recuperação, enquanto que mantiveram a capacidade fagocítica em ensaios funcionais.

Esses resultados contrastam com os que observamos na nossa coorte, onde sepse relacionou-se a um perfil mais consistentemente sugestivo de imunossupressão. Um dos principais destaques na análise funcional da fase aguda da sepse foi a redução de moléculas relacionadas à via de apresentação de antígenos por MHC de classe II, como o HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ, o que é concordante com os nossos ensaios prévios de citometria de fluxo e foi revertido na fase de recuperação. A esse achado associou-se a

modulação concomitante de alguns dos mediadores centrais da ativação inflamatória. Por exemplo, a MAP quinase-1 (MAPK-1), regulada negativamente na fase aguda da sepse, pertence ao grupo das quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) que, em conjunto com as p38 MAP-kinases e as cJun NH2-terminal quinases (JNK), são ativadas por estímulos como TNF- α , IL-1 e a ligação a TLR, participando da sinalização efetora da resposta inflamatória pela ativação de fatores de transcrição como o AP-1 (187). Da mesma forma, observamos uma redução da caspase-1, um ponto de convergência da ativação de inflamassomas, que gera as formas biologicamente ativas das citocinas IL-1 β e IL-18 a partir de precursores e também participa da piroptose, uma forma de morte celular induzida pela inflamação (188). Uma categoria da análise funcional que inicialmente chamou a nossa atenção foi a da via de sinalização pelo PD-1, um receptor co-inibitório relacionado à exaustão de células T, que vem despertando interesse como um alvo terapêutico na sepse (189). No entanto, as proteínas correspondentes à anotação (CSK, HLA-DPA1 HLA-DQA2, HLA-DRA, HLA-DRB1) não são específicas, refletindo simplesmente a importância da ligação entre receptores MHC e TCR como um sinal concomitante no contexto da ativação dessa via (190). Uma molécula que se destacou na análise das redes de interação pela sua centralidade foi a proteína de choque térmico 90 (HSP90). Em situações de estresse, a HSP90 é regulada positivamente por atuar como um *chaperone* molecular, estabilizando proteínas envolvidas em um grande número de processos celulares (191). No âmbito da sepse, um estudo recente demonstrou que essa proteína é capaz de inibir a apoptose em neutrófilos do sangue periférico de pacientes (192). É interessante especular se a HSP90 também poderia alterar as características de sobrevivência e maturação das células do sistema monocítico fagocitário na sepse.

Um evento importante que acompanhou a recuperação dos pacientes em nosso estudo foi a regulação positiva de proteínas relacionadas a vias de sinalização por citocinas, particularmente o IFN- γ . Desde sua descrição, inicialmente como o “fator de ativação de macrófagos”, o IFN- γ é reconhecido como um potente estímulo indutor de respostas pró-inflamatórias em células do sistema monocítico fagocitário (193). Essa citocina atua ligando-se a um receptor específico na superfície celular, associado às tirosina-quinases JAK1 e JAK2, capazes de ativar o fator de transcrição STAT1, formando homodímeros que translocam para o núcleo e se ligam a sítios denominados *gamma-activated sequences* (GAS) nas regiões promotoras de determinados genes, induzindo a sua transcrição (194). Age também

por mecanismos epigenéticos que proporcionam um ambiente sinérgico à sinalização por TLR, o que é empregado em modelos *in vitro* de ativação M1 pelo *priming* das células com IFN- γ (195). Além disso, os interferons ativam paralelamente a cascata de sinalização da fostatidil-inositol-3-kinase (PI3K), relacionada ao mTORC e HIF-1, o que sugere que essas citocinas são um ponto de conexão mecânica do imunometabolismo (194,196). Na sepse, o efeito imunorregulatório do IFN- γ já foi explorado como uma potencial terapia em alguns estudos. Docke e colaboradores demonstraram que o tratamento de pacientes com o IFN- γ é capaz de restaurar a expressão de HLA-DR monocítica e a secreção de TNF- α mediante o estímulo *ex vivo* com LPS (197). Em um ensaio clínico randomizado e placebo-controlado que incluiu pacientes com trauma grave, Dries e colaboradores observaram uma redução da mortalidade associada à infecção no grupo tratado com o IFN- γ (198). Nesse contexto, a sinalização pelo IFN- γ pode ter sido um fator importante para a restauração da função imune e a resolução da sepse nos pacientes na nossa coorte.

As diferenças entre as nossas observações e as de Shalova e colaboradores podem ser decorrentes das características das populações estudadas: enquanto que no nosso estudo os pacientes apresentaram sepse de foco e microbiologia variados, Shalova e colaboradores investigaram mais especificamente pacientes com infecção urinária por bactérias gram-negativas. Além disso, os autores incluíram pacientes diagnosticados com sepse de acordo com os critérios do consenso de 2001, que não requerem a presença de disfunções orgânicas (12). Isso pode ter levado à seleção de pacientes menos graves, o que infelizmente não foi reportado na publicação, quando comparados à nossa população, onde os pacientes apresentaram um escore SOFA elevado e choque hemodinâmico. Outro ponto a ser ressaltado é que a nossa coleta da fase de recuperação foi realizada em um momento mais precoce da evolução, o que gerou um padrão geral de expressão mais distinto em relação ao grupo controle. A esse respeito, uma ferramenta analítica interessante que empregamos foi o escore MDP, que se mostrou mais sensível para capturar essas diferenças do que biomarcadores tradicionais, como a proteína C reativa, ou o escore SOFA. No futuro, seria interessante correlacionar o escore MDP com as características da evolução clínica dos indivíduos em coortes maiores de pacientes com sepse e com desfechos variados. Além das diferenças relacionadas às populações, é curioso observar que a ambiguidade de sinais pró e anti-inflamatórios observada no estudo de Shalova e colaboradores é uma característica

reportada em outros estudos de transcriptômica que não é usualmente reproduzida na literatura por técnicas baseadas em proteínas, conforme exposto na Figura 1.2.

Até o momento, a mais extensa investigação do imunometabolismo de pacientes com sepse foi publicada no ano de 2016 por Cheng e colaboradores (97). Nesse estudo, os autores investigaram o perfil de expressão gênica do sangue total obtido nas primeiras 24 horas de internação na UTI de 46 pacientes com sepse bacteriana (com hemoculturas positivas para *E.coli*) ou fúngica (com hemoculturas positivas para *C. albicans*), que foram comparados a 42 controles saudáveis. Os marcadores de gravidade se aproximam daqueles observados na nossa coorte. Nos pacientes com sepse, a expressão dos genes relacionados à ativação inflamatória encontrava-se reduzida. Na avaliação dirigida aos genes do metabolismo energético, os autores observaram um aumento da expressão relacionada tanto à glicólise quanto à fosforilação oxidativa na sepse. Ao realizarem ensaios funcionais em PBMCs de um pequeno número de pacientes, no entanto, o padrão observado foi de redução da respiração mitocondrial, semelhante ao reportado por Japiassu e colaboradores (103).

Em nosso estudo destacaram-se na análise de vias bioquímicas diferencialmente reguladas na sepse um aumento da glicólise, associado à redução da fosforilação oxidativa, um padrão sugestivo da glicólise aeróbia. A regulação positiva da maior parte das enzimas da glicólise foi acompanhada pelo aumento da lactato desidrogenase, indicando que houve um desvio do fluxo glicolítico para a produção de lactato. Além disso, enzimas relacionadas à beta oxidação de ácidos graxos foram negativamente reguladas, o que sugere que houve uma redução do aporte de substratos para o ciclo do ácido cítrico. Um outro ponto de controle descrito na literatura, mas que não fomos capazes de mensurar, é a isoenzima M2 da piruvato kinase (PKM2), que desacelera a glicólise, possibilitando o desvio metabólitos intermediários para vias biossintéticas, e também pode estar envolvida na regulação da atividade de HIF-1 (199,200). Dentro do ciclo do ácido cítrico, a redução que observamos da enzima succinil-CoA ligase (SUCLG2), que catalisa a conversão de succinil-CoA a succinato, é um dado contrário ao acúmulo desse metabólito reportado em modelos *in vitro* (94).

O contraste entre os nossos resultados e os da análise transcriptômica de Cheng e colaboradores podem ser decorrentes de particularidades metodológicas: as discrepâncias entre níveis de mRNA e proteínas pela ação de mecanismos pós-transcricionais, bem como a análise de células isoladas em oposição ao sangue total, composto por diversos tipos

celulares com padrões de expressão distintos. Por outro lado, naquele estudo, a expressão de genes mais especificamente associados à ativação inflamatória de monócitos, como os relacionados à apresentação de antígenos, encontrava-se reduzida na sepse, de forma semelhante às nossas observações. Nossos resultados também diferem das características decorrentes da ativação M1, onde a glicólise aeróbia acompanha um fenótipo pró-inflamatório clássico. A esse respeito, a glicólise aeróbia na fase precoce da sepse poderia ser um evento promotor da transição para a imunocompetência observada na fase de recuperação. Alternativamente, poderia representar um estado resultante da versatilidade da adaptação dos monócitos à perturbação peculiar da sepse clínica, sem correspondência nos modelos *in vitro*. Seria interessante avaliar se esse fenótipo difere entre pacientes com desfechos clínicos distintos, o que não foi possível na nossa coorte, onde todos os pacientes sobreviveram e tiveram alta da UTI.

No presente estudo, realizamos pela primeira vez a avaliação da proteômica de monócitos na sepse clínica. A abordagem *shotgun* é um instrumento poderoso e ainda subutilizado para a identificação de perfis moleculares que permitam a caracterização de fenômenos biológicos. Para a nossa investigação, essa técnica representou um marco que possibilitou acessarmos de forma direta e abrangente a informação biológica das amostras clínicas. Acreditamos que obtenção de dados em larga escala no nível das proteínas é um complemento valioso aos estudos de transcriptômica que dominam o campo, e pode ajudar a resolver as discrepâncias entre os modelos da fisiopatologia da sepse adotados atualmente.

As principais limitações do nosso experimento de proteômica *shotgun* estão relacionadas, direta ou indiretamente, a questões técnicas. Primeiramente, a abundância relativa de proteínas pode não ser representativa da ativação funcional de uma via, principalmente no que diz respeito à sinalização imune, dependente de modificações pós-translacionais como a fosforilação. Nesse sentido, técnicas de fosfoproteômica ou imunodeteção poderiam representar um complemento importante, mas requerem um preparo específico e quantidades de amostras superiores às que obtivemos. Com relação ao número de pacientes avaliado, dada a heterogeneidade característica de amostras clínicas, julgamos que seria desejável a análise de uma coorte maior. Além da dificuldade de obtenção do material de pacientes graves e inconscientes, que requer a autorização de responsáveis legais; o principal limitador nesse caso foi o tempo relativamente longo da

aquisição de LC-MS/MS: para as 24 amostras estudadas: aproximadamente 4 semanas. Esse último fator é um obstáculo transponível pelo investimento institucional no sentido de proporcionar um maior acesso aos equipamentos. Por exemplo, um estudo recente de um grupo da Alemanha reportou, utilizando um protocolo de semelhante ao nosso, a análise 1294 amostras clínicas em um intervalo de 10 semanas (201). Finalmente, conforme exposto na Seção 4.3.1, a amostragem esparsa dos peptídeos é uma característica da aquisição dependente de dados (DDA) de amostras complexas, e requer um compromisso entre a reprodutibilidade e a abrangência das identificações. Devido ao objetivo exploratório do nosso estudo, optamos por ser inicialmente mais inclusivos em relação ao número mínimo de identificações por grupo, selecionando posteriormente um subgrupo de proteínas com alta cobertura que julgamos serem representativas das hipóteses levantadas pela análise do conjunto completo dos dados.

Dentro da técnica de DDA, uma solução interessante proposta recentemente para o problema dos valores em falta foi a atribuição cruzada das identificações de MS/MS aos espectros correspondentes de MS de outras amostras onde o precursor não foi selecionado para a fragmentação (202). Além disso, o desenvolvimento de técnicas de aquisição independente de dados vem avançando de forma importante nos últimos anos. Um exemplo é o método de SWATH-MS, onde as identificações são realizadas a partir da fragmentação de todos os íons precursores, isolados em janelas sequenciais de m/z (203). Outra forma de análise, a qual tivemos acesso, é o SRM, que apresenta características complementares à DDA: Por ser um método de proteômica dirigida, requer a pré-seleção dos peptídeos que serão monitorados, baseando-se normalmente em hipóteses geradas por experimentos anteriores. Ao mesmo tempo, as aquisições são altamente reprodutíveis, com raros valores em falta, sendo possível a mensuração de até aproximadamente 100 proteínas com um bom desempenho analítico (120). Além disso, as corridas cromatográficas são tipicamente mais curtas do que em experimentos de proteômica *shotgun*, permitindo a análise de mais amostras utilizando o mesmo tempo de máquina. Portanto, julgamos que a técnica de SRM seria uma solução apropriada para a validação e aprofundamento do estudo das alterações do metabolismo energético que observamos previamente.

O desenvolvimento de um ensaio de SRM, conforme exposto na Seção 3.7.1, requer múltiplas etapas de refinamento e validação empíricas do método antes da análise quantitativa das amostras. Em nossos experimentos, fomos capazes de monitorar

qualitativamente 273 transições referentes a 63 proteínas, mas a quantificação relativa não foi possível pela variação que observamos entre as replicatas técnicas, o que acreditamos estar relacionado ao desenho experimental. Na grande maioria das publicações de SRM, peptídeos isotopicamente marcados correspondentes aos precursores-alvo são adicionados às amostras, servindo como uma referência tanto para as identificações como para a normalização do sinal. A metodologia que utilizamos, sem marcação (*label-free*), permite a análise de um grande número de peptídeos de forma custo-efetiva e sem aumentar a complexidade das amostras. No entanto, tem as desvantagens de ser suscetível a variações na preparação das amostras e no desempenho da cromatografia e espectrometria de massas (204). Acreditamos que as questões técnicas que encontramos podem ser resolvidas pela introdução de padrões de referência nas amostras, e que a combinação de experimentos de proteômica *shotgun* e dirigida possui um grande potencial de aplicabilidade no estudo da sepse clínica.

Em conclusão, os estudos que compõem essa tese sugerem que a transição para a glicólise aeróbia em monócitos é um fenômeno proeminente na sepse, não somente em modelos experimentais, mas também na clínica. Além disso, fomos capazes de demonstrar a associação dessas alterações metabólicas aos estados de ativação imune que acompanham os pacientes nas fases aguda e de recuperação (Figura 5.4). O perfil da coorte foi inicialmente sugestivo de imunossupressão, sendo sucedido pela restauração da imunocompetência, que foi documentada do ponto de vista molecular pela regulação positiva de proteínas envolvidas apresentação de antígenos e sinalização por citocinas, e do ponto de vista clínico pela resolução da infecção e das disfunções orgânicas. A utilização de métodos de proteômica nos permitiu apresentar uma contribuição original para o campo da pesquisa da sepse, bem como propor estratégias para o aperfeiçoamento técnico a ser aplicado ao fluxo da análise de amostras clínicas em experimentos futuros.

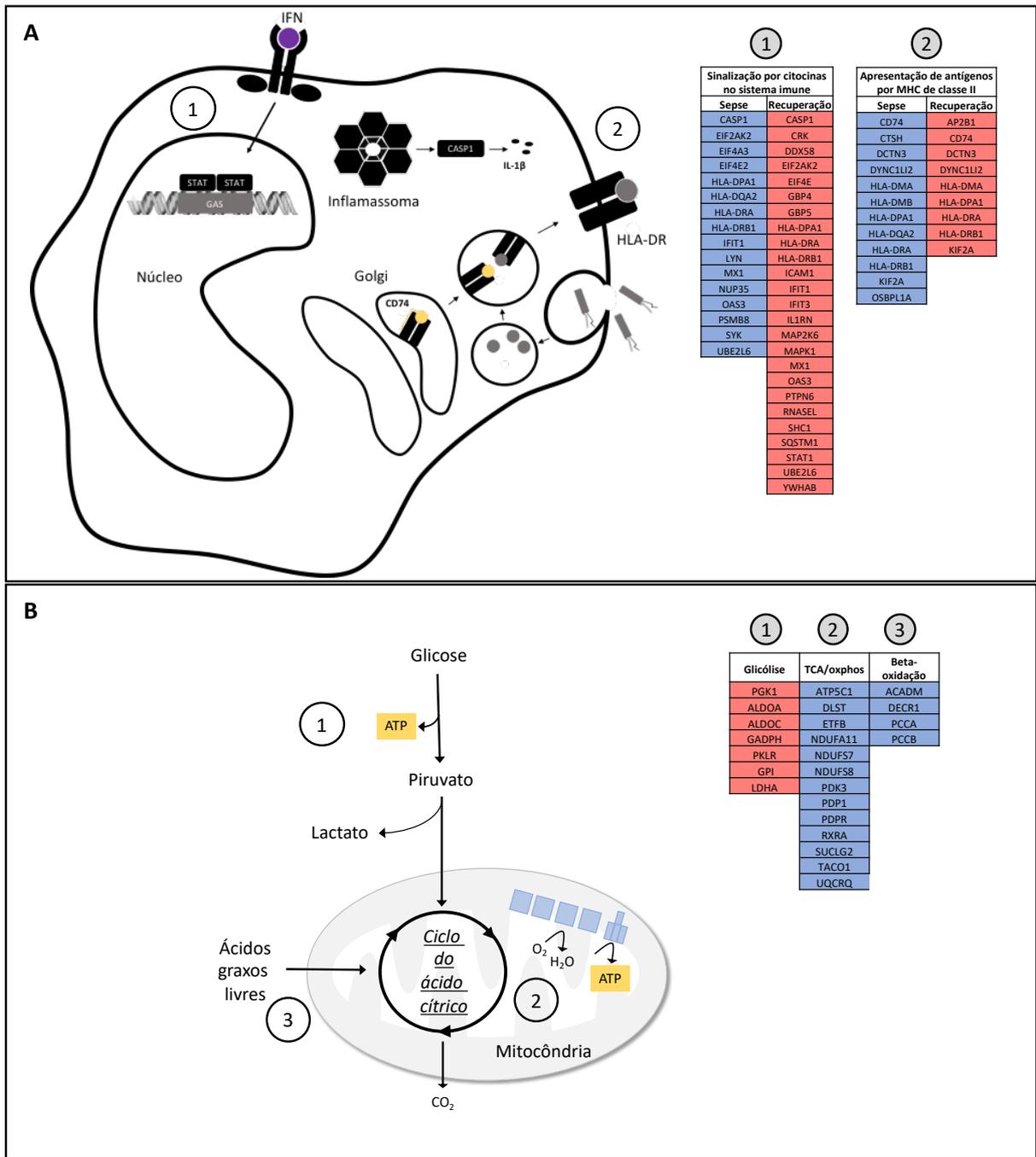


Figura 5.4 Resumo dos principais achados relativos ao fenótipo imunometabólico. (A): Regulação das vias relacionadas à inflamação nos grupos Sepse em (relação ao grupo Controle) e Recuperação (em relação ao grupo Sepse) (B): Regulação das vias metabólicas no grupo Sepse (em relação ao grupo Controle). Estão representadas as vias e nomes dos genes relativos às proteínas reguladas com significância estatística.

Referências bibliográficas

1. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word “sepsis.” *Intensive Care Med.* 2006 Dec;32(12):2077.
2. Werdan K. Sepsis. *Internist.* 2009 Jul 1;50(7):777–8.
3. Haddad IB e H. A formulação do conceito de homeostase por Walter Cannon. *Filos E História Biol.* 2017;12(1):99–113.
4. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1998;10(2):230–1.
5. Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg.* 1973 Aug;178(2):117–22.
6. Baue AE. Multiple, progressive, or sequential systems failure. A syndrome of the 1970s. *Arch Surg Chic Ill 1960.* 1975 Jul;110(7):779–81.
7. Opal SM. The evolution of the understanding of sepsis, infection, and the host response: a brief history. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2011 Mar;23(1):1–27.
8. Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. Crit Care Med.* 1989 May;17(5):389–93.
9. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992 Jun;101(6):1644–55.
10. Sprung CL, Sakr Y, Vincent J-L, Le Gall J-R, Reinhart K, Ranieri VM, et al. An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence In Acutely Ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med.* 2006 Mar;32(3):421–7.
11. Lai NA, Kruger P. The predictive ability of a weighted systemic inflammatory response syndrome score for microbiologically confirmed infection in hospitalised patients with suspected sepsis. *Crit Care Resusc J Australas Acad Crit Care Med.* 2011 Sep;13(3):146–50.
12. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003 Apr;29(4):530–8.
13. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016 Feb 23;315(8):801–10.

14. Carneiro AH, Póvoa P, Gomes JA. Dear Sepsis-3, we are sorry to say that we don't like you. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2017 Mar;29(1):4–8.
15. Abraham E. New Definitions for Sepsis and Septic Shock: Continuing Evolution but With Much Still to Be Done. *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):757–9.
16. Machado FR, Assunção MSC de, Cavalcanti AB, Japiassú AM, Azevedo LCP de, Oliveira MC. Getting a consensus: advantages and disadvantages of Sepsis 3 in the context of middle-income settings. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2016 Dec;28(4):361–5.
17. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013 Dec;13(12):862–74.
18. Vincent J-L, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet Lond Engl*. 2013 Mar 2;381(9868):774–5.
19. Buchman TG. The community of the self. *Nature*. 2002 Nov 14;420(6912):246–51.
20. WHO. Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis (WHA70.7) [Internet]. [cited 2018 May 7]. Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA70/A70_R7-en.pdf
21. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Feb 1;193(3):259–72.
22. Becker JU, Theodosis C, Jacob ST, Wira CR, Groce NE. Surviving sepsis in low-income and middle-income countries: new directions for care and research. *Lancet Infect Dis*. 2009 Sep;9(9):577–82.
23. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*. 2013 May;41(5):1167–74.
24. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006 Feb;34(2):344–53.
25. Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, et al. [An epidemiological study of sepsis in Intensive Care Units: Sepsis Brazil study]. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2006 Mar;18(1):9–17.
26. Sogayar AMC, Machado FR, Rea-Neto A, Dornas A, Grion CMC, Lobo SMA, et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. *PharmacoEconomics*. 2008;26(5):425–34.
27. Silva E, Pedro M de A, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CL de O, Janiszewski M, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care Lond Engl*. 2004 Aug;8(4):R251–60.

28. Beale R, Reinhart K, Brunkhorst FM, Dobb G, Levy M, Martin G, et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. *Infection*. 2009 Jun;37(3):222–32.
29. Machado FR, Cavalcanti AB, Bozza FA, Ferreira EM, Angotti Carrara FS, Sousa JL, et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. *Lancet Infect Dis*. 2017 Nov;17(11):1180–9.
30. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 2010 Oct 27;304(16):1787–94.
31. Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med*. 2010 May;38(5):1276–83.
32. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med*. 2006 Jan;34(1):15–21.
33. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003 Apr 17;348(16):1546–54.
34. Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B, CUB-Réa Network. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jul 15;168(2):165–72.
35. Sutherland AM, Walley KR. Bench-to-bedside review: Association of genetic variation with sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 2009;13(2):210.
36. Gupta S, Sakhuja A, Kumar G, McGrath E, Nanchal RS, Kashani KB. Culture-Negative Severe Sepsis: Nationwide Trends and Outcomes. *Chest*. 2016 Dec;150(6):1251–9.
37. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 2009 Dec 2;302(21):2323–9.
38. Ljungström LR, Jacobsson G, Claesson BEB, Andersson R, Enroth H. Respiratory viral infections are underdiagnosed in patients with suspected sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2017 Oct;36(10):1767–76.
39. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. 2017 Mar;43(3):304–77.
40. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med*. 2014 Aug;42(8):1749–55.

41. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;345(19):1368–77.
42. Nguyen HB, Jaehne AK, Jayaprakash N, Semler MW, Hegab S, Yataco AC, et al. Early goal-directed therapy in severe sepsis and septic shock: insights and comparisons to ProCESS, ProMISe, and ARISE. *Crit Care Lond Engl*. 2016 Jul 1;20(1):160.
43. Gattinoni L, Brazzi L, Pelosi P, Latini R, Tognoni G, Pesenti A, et al. A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. SvO2 Collaborative Group. *N Engl J Med*. 1995 Oct 19;333(16):1025–32.
44. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med*. 2018 Apr 19;
45. Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, Kunz R, Falck-Ytter Y, Alonso-Coello P, et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ*. 2008 Apr 26;336(7650):924–6.
46. Levy MM, Rhodes A, Phillips GS, Townsend SR, Schorr CA, Beale R, et al. Surviving Sepsis Campaign: association between performance metrics and outcomes in a 7.5-year study. *Crit Care Med*. 2015 Jan;43(1):3–12.
47. Kaukonen K-M, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000–2012. *JAMA*. 2014 Apr 2;311(13):1308–16.
48. Marshall JC. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med*. 2014 Apr;20(4):195–203.
49. Sprung CL, Caralis PV, Marcial EH, Pierce M, Gelbard MA, Long WM, et al. The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. A prospective, controlled study. *N Engl J Med*. 1984 Nov 1;311(18):1137–43.
50. McCloskey RV, Straube RC, Sanders C, Smith SM, Smith CR. Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHES Trial Study Group. *Ann Intern Med*. 1994 Jul 1;121(1):1–5.
51. Webster NR, Galley HF. Immunomodulation in the critically ill. *Br J Anaesth*. 2009 Jul;103(1):70–81.
52. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001 Mar 8;344(10):699–709.
53. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut J-F, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*. 2012 May 31;366(22):2055–64.

54. Fink MP, Warren HS. Strategies to improve drug development for sepsis. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Oct;13(10):741–58.
55. Opal SM, Dellinger RP, Vincent J-L, Masur H, Angus DC. The next generation of sepsis clinical trial designs: what is next after the demise of recombinant human activated protein C?*. *Crit Care Med.* 2014 Jul;42(7):1714–21.
56. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Oct;4(10):854–65.
57. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7):1303–10.
58. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA.* 1995 Jan 11;273(2):117–23.
59. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 26;110(9):3507–12.
60. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med.* 2011 Dec 19;208(13):2581–90.
61. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care Lond Engl.* 2010;14(1):R15.
62. Vincent J-L. The coming era of precision medicine for intensive care. *Crit Care Lond Engl.* 2017 Dec 28;21(Suppl 3):314.
63. Burnham KL, Davenport EE, Radhakrishnan J, Humburg P, Gordon AC, Hutton P, et al. Shared and Distinct Aspects of the Sepsis Transcriptomic Response to Fecal Peritonitis and Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Aug 1;196(3):328–39.
64. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:257–90.
65. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010 Dec;10(12):826–37.
66. Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol.* 2017 Mar;17(3):151–64.
67. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science.* 1986 Oct 24;234(4775):470–4.
68. Smith JW, Urba WJ, Curti BD, Elwood LJ, Steis RG, Janik JE, et al. The toxic and hematologic effects of interleukin-1 alpha administered in a phase I trial to patients

- with advanced malignancies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1992 Jul;10(7):1141–52.
69. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*. 1996 Jul;24(7):1125–8.
 70. Torgersen C, Moser P, Luckner G, Mayr V, Jochberger S, Hasibeder WR, et al. Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis. *Anesth Analg*. 2009 Jun;108(6):1841–7.
 71. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*. 2013 Mar;13(3):260–8.
 72. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*. 2011 Dec 21;306(23):2594–605.
 73. Van Vught LA, Klein Klouwenberg PMC, Spitoni C, Scicluna BP, Wiewel MA, Horn J, et al. Incidence, Risk Factors, and Attributable Mortality of Secondary Infections in the Intensive Care Unit After Admission for Sepsis. *JAMA*. 2016 Apr 12;315(14):1469–79.
 74. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care Lond Engl*. 2005;9 Suppl 4:S13–9.
 75. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1999 Jul;27(7):1230–51.
 76. Boekstegers P, Weidenhöfer S, Pilz G, Werdan K. Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: comparison to limited infection and cardiogenic shock. *Infection*. 1991 Oct;19(5):317–23.
 77. Singer M. Critical illness and flat batteries. *Crit Care Lond Engl*. 2017 28;21(Suppl 3):309.
 78. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):633–43.
 79. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):e74–80.
 80. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011 Oct 10;11(11):762–74.
 81. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:421–52.
 82. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jun;17(6):349–62.

83. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):14–20.
84. Rodríguez-Prados J-C, Través PG, Cuenca J, Rico D, Aragonés J, Martín-Sanz P, et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Jul 1;185(1):605–14.
85. Garedew A, Moncada S. Mitochondrial dysfunction and HIF1 stabilization in inflammation. *J Cell Sci*. 2008 Oct 15;121(20):3468–75.
86. Otto AM. Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer Metab*. 2016;4:5.
87. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029–33.
88. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar 1;41(3):211–8.
89. Nagy C, Haschemi A. Time and Demand are Two Critical Dimensions of Immunometabolism: The Process of Macrophage Activation and the Pentose Phosphate Pathway. *Front Immunol*. 2015;6:164.
90. Moon J-S, Hisata S, Park M-A, DeNicola GM, Ryter SW, Nakahira K, et al. mTORC1-Induced HK1-Dependent Glycolysis Regulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Cell Rep*. 2015 Jul 7;12(1):102–15.
91. Jha AK, Huang SC-C, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*. 2015 Mar 17;42(3):419–30.
92. Infantino V, Convertini P, Cucci L, Panaro MA, Di Noia MA, Calvello R, et al. The mitochondrial citrate carrier: a new player in inflammation. *Biochem J*. 2011 Sep 15;438(3):433–6.
93. Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 7;110(19):7820–5.
94. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. 2013 Apr 11;496(7444):238–42.
95. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, et al. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab*. 2012 Jun 6;15(6):813–26.

96. Loftus RM, Finlay DK. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. *J Biol Chem*. 2016 Jan 1;291(1):1–10.
97. Cheng S-C, Scicluna BP, Arts RJW, Gresnigt MS, Lachmandas E, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nat Immunol*. 2016 Apr;17(4):406–13.
98. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, Mills KHG, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016 Apr 22;352(6284):aaf1098.
99. Cheng S-C, Quintin J, Cramer RA, Shephardson KM, Saeed S, Kumar V, et al. mTOR- and HIF-1 -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. 2014 Sep 26;345(6204):1250684–1250684.
100. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. 1991 Nov;88(5):1747–54.
101. Lukaszewicz A-C, Griénay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, et al. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: Interest for prognosis and secondary infection prediction*: *Crit Care Med*. 2009 Oct;37(10):2746–52.
102. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard A-L, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006 Aug;32(8):1175–83.
103. Japiassú AM, Santiago APSA, d'Avila J da CP, Garcia-Souza LF, Galina A, Castro Faria-Neto HC, et al. Bioenergetic failure of human peripheral blood monocytes in patients with septic shock is mediated by reduced F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity*: *Crit Care Med*. 2011 May;39(5):1056–63.
104. Belikova I, Lukaszewicz AC, Faivre V, Damoiseil C, Singer M, Payen D. Oxygen consumption of human peripheral blood mononuclear cells in severe human sepsis*: *Crit Care Med*. 2007 Dec;35(12):2702–8.
105. Yadav SP. The Wholeness in Suffix -omics, -omes, and the Word Om. *J Biomol Tech JBT*. 2007 Dec;18(5):277.
106. Aebersold R, Hood LE, Watts JD. Equipping scientists for the new biology. *Nat Biotechnol*. 2000 Apr;18(4):359.
107. Seely AJ, Christou NV. Multiple organ dysfunction syndrome: exploring the paradigm of complex nonlinear systems. *Crit Care Med*. 2000 Jul;28(7):2193–200.
108. Aderem A. Systems biology: its practice and challenges. *Cell*. 2005 May 20;121(4):511–3.

109. Rautanen A, Mills TC, Gordon AC, Hutton P, Steffens M, Nuamah R, et al. Genome-wide association study of survival from sepsis due to pneumonia: an observational cohort study. *Lancet Respir Med*. 2015 Jan;3(1):53–60.
110. Scherag A, Schönebeck F, Kesselmeier M, Taudien S, Platzer M, Felder M, et al. Genetic Factors of the Disease Course after Sepsis: A Genome-Wide Study for 28 Day Mortality. *EBioMedicine*. 2016 Sep 15;12:239–46.
111. Sud A, Kinnersley B, Houlston RS. Genome-wide association studies of cancer: current insights and future perspectives. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(11):692–704.
112. Taudien S, Lausser L, Giamarellos-Bourboulis EJ, Sponholz C, Schönebeck F, Felder M, et al. Genetic Factors of the Disease Course After Sepsis: Rare Deleterious Variants Are Predictive. *EBioMedicine*. 2016 Oct;12:227–38.
113. Shalova IN, Lim JY, Chittezhath M, Zinkernagel AS, Beasley F, Hernández-Jiménez E, et al. Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity*. 2015 Mar 17;42(3):484–98.
114. Davenport EE, Burnham KL, Radhakrishnan J, Humburg P, Hutton P, Mills TC, et al. Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2016 Apr;4(4):259–71.
115. Ma Y, Vilanova D, Atalar K, Delfour O, Edgeworth J, Ostermann M, et al. Genome-wide sequencing of cellular microRNAs identifies a combinatorial expression signature diagnostic of sepsis. *PLoS One*. 2013;8(10):e75918.
116. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*. 2016 Apr 21;165(3):535–50.
117. Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom JMS*. 2001 Oct;36(10):1083–91.
118. Sharma NK, Salomao R. Sepsis Through the Eyes of Proteomics: The Progress in the Last Decade. *Shock Augusta Ga*. 2017;47(1S Suppl 1):17–25.
119. Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol Syst Biol [Internet]*. 2017 Sep 26;13(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5615924/>
120. Picotti P, Aebersold R. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Methods*. 2012 May 30;9(6):555–66.
121. Kalenka A, Feldmann RE, Otero K, Maurer MH, Waschke KF, Fiedler F. Changes in the serum proteome of patients with sepsis and septic shock. *Anesth Analg*. 2006 Dec;103(6):1522–6.
122. Shen Z, Want EJ, Chen W, Keating W, Nussbaumer W, Moore R, et al. Sepsis plasma protein profiling with immunodepletion, three-dimensional liquid chromatography

- tandem mass spectrometry, and spectrum counting. *J Proteome Res.* 2006 Nov;5(11):3154–60.
123. Soares AJC, Santos MF, Trugilho MRO, Neves-Ferreira AGC, Perales J, Domont GB. Differential proteomics of the plasma of individuals with sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*. *J Proteomics.* 2009 Dec 1;73(2):267–78.
 124. Gong Y, Chen N, Wang F-Q, Wang Z-H, Xu H-X. Serum proteome alteration of severe sepsis in the treatment of continuous renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2009 Oct;24(10):3108–14.
 125. Paiva RA de, David CM, Domont GB. Proteomics in sepsis: a pilot study. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2010 Dec;22(4):403–12.
 126. Lin C-H, Wang P-W, Pan T-L, Bazylak G, Liu EK-W, Wei F-C. Proteomic profiling of oxidative stress in human victims of traffic-related injuries after lower limb revascularization and indication for secondary amputation. *J Pharm Biomed Anal.* 2010 Feb 5;51(3):784–94.
 127. Buhimschi CS, Bhandari V, Dulay AT, Nayeri UA, Abdel-Razeq SS, Pettker CM, et al. Proteomics Mapping of Cord Blood Identifies Haptoglobin “Switch-On” Pattern as Biomarker of Early-Onset Neonatal Sepsis in Preterm Newborns. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 Oct 10;6(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189953/>
 128. Triantafilou M, Mouratis M-A, Lepper PM, Haston RM, Baldwin F, Lowes S, et al. Serum proteins modulate lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced activation and contribute to the clinical outcome of sepsis. *Virulence.* 2012 Apr;3(2):136–45.
 129. Daigo K, Yamaguchi N, Kawamura T, Matsubara K, Jiang S, Ohashi R, et al. The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2012 Jun;11(6):M111.015073.
 130. Langley RJ, Tsalik EL, van Velkinburgh JC, Glickman SW, Rice BJ, Wang C, et al. An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis. *Sci Transl Med.* 2013 Jul 24;5(195):195ra95.
 131. Su L, Cao L, Zhou R, Jiang Z, Xiao K, Kong W, et al. Identification of novel biomarkers for sepsis prognosis via urinary proteomic analysis using iTRAQ labeling and 2D-LC-MS/MS. *PLoS One.* 2013;8(1):e54237.
 132. Liu J, Li J, Deng X. Proteomic analysis of differential protein expression in platelets of septic patients. *Mol Biol Rep.* 2014 May;41(5):3179–85.
 133. Cao Z, Yende S, Kellum JA, Angus DC, Robinson RAS. Proteomics reveals age-related differences in the host immune response to sepsis. *J Proteome Res.* 2014 Feb 7;13(2):422–32.

134. Sylvester KG, Ling XB, Liu GY-G, Kastenber ZJ, Ji J, Hu Z, et al. Urine protein biomarkers for the diagnosis and prognosis of necrotizing enterocolitis in infants. *J Pediatr*. 2014 Mar;164(3):607–12.e1–7.
135. Malmström E, Davidova A, Mörgelin M, Linder A, Larsen M, Qvortrup K, et al. Targeted mass spectrometry analysis of neutrophil-derived proteins released during sepsis progression. *Thromb Haemost*. 2014 Dec;112(6):1230–43.
136. DeCoux A, Tian Y, DeLeon-Pennell KY, Nguyen NT, de Castro Brás LE, Flynn ER, et al. Plasma Glycoproteomics Reveals Sepsis Outcomes Linked to Distinct Proteins in Common Pathways. *Crit Care Med*. 2015 Oct;43(10):2049–58.
137. Pinheiro da Silva F, Cataldi TR, de Lima TM, Starzynski PN, Barbeiro HV, Labate MTV, et al. Proteomic profiling identifies N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase as a novel biomarker of sepsis. *Biomark Med*. 2016 Dec;10(12):1225–9.
138. Stewart CJ, Nelson A, Treumann A, Skeath T, Cummings SP, Embleton ND, et al. Metabolomic and proteomic analysis of serum from preterm infants with necrotising enterocolitis and late-onset sepsis. *Pediatr Res*. 2016 Mar;79(3):425–31.
139. Hashida T, Nakada T-A, Satoh M, Tomita K, Kawaguchi R, Nomura F, et al. Proteome analysis of hemofilter adsorbates to identify novel substances of sepsis: a pilot study. *J Artif Organs Off J Jpn Soc Artif Organs*. 2017 Jun;20(2):132–7.
140. Sharma NK, Tashima AK, Brunialti MKC, Ferreira ER, Torquato RJS, Mortara RA, et al. Proteomic study revealed cellular assembly and lipid metabolism dysregulation in sepsis secondary to community-acquired pneumonia. *Sci Rep*. 2017 Nov 15;7(1):15606.
141. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Mar 22;13(4):263–9.
142. Seymour CW, Yende S, Scott MJ, Pribis J, Mohny RP, Bell LN, et al. Metabolomics in pneumonia and sepsis: an analysis of the GenIMS cohort study. *Intensive Care Med*. 2013 Aug;39(8):1423–34.
143. Cambiaghi A, Pinto BB, Brunelli L, Falcetta F, Aletti F, Bendjelid K, et al. Characterization of a metabolomic profile associated with responsiveness to therapy in the acute phase of septic shock. *Sci Rep*. 2017 Aug 29;7(1):9748.
144. Chervitz SA, Deutsch EW, Field D, Parkinson H, Quackenbush J, Rocca-Serra P, et al. Data standards for Omics data: the basis of data sharing and reuse. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;719:31–69.
145. Sparks R, Lau WW, Tsang JS. Expanding the Immunology Toolbox: Embracing Public-Data Reuse and Crowdsourcing. *Immunity*. 2016 20;45(6):1191–204.
146. Moreno RP, Metnitz PGH, Almeida E, Jordan B, Bauer P, Campos RA, et al. SAPS 3—From evaluation of the patient to evaluation of the intensive care unit. Part 2:

- Development of a prognostic model for hospital mortality at ICU admission. *Intensive Care Med.* 2005 Oct;31(10):1345–55.
147. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996 Jul;22(7):707–10.
 148. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680–5.
 149. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.* 2006;1(4):1852–8.
 150. Michalski A, Damoc E, Hauschild J-P, Lange O, Wiegand A, Makarov A, et al. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2011 Sep;10(9):M111.011015.
 151. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF, et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc.* 2016 Jan;11(1):102–17.
 152. Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods.* 2007 Mar;4(3):207–14.
 153. Carvalho PC, Yates JR, Barbosa VC. Improving the TFCM test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics.* 2012 Jun 15;28(12):1652–4.
 154. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF, et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc.* 2016 Jan;11(1):102–17.
 155. Prada-Medina CA, Fukutani KF, Pavan Kumar N, Gil-Santana L, Babu S, Lichtenstein F, et al. Systems Immunology of Diabetes-Tuberculosis Comorbidity Reveals Signatures of Disease Complications. *Sci Rep.* 2017 May 17;7(1):1999.
 156. Lynn DJ, Winsor GL, Chan C, Richard N, Laird MR, Barsky A, et al. InnateDB: facilitating systems-level analyses of the mammalian innate immune response. *Mol Syst Biol.* 2008;4:218.
 157. Fabregat A, Sidiropoulos K, Garapati P, Gillespie M, Hausmann K, Haw R, et al. The Reactome pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D481–7.
 158. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003 Nov;13(11):2498–504.

159. Chin C-H, Chen S-H, Wu H-H, Ho C-W, Ko M-T, Lin C-Y. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol.* 2014;8 Suppl 4:S11.
160. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinforma Oxf Engl.* 2010 Apr 1;26(7):966–8.
161. Choi M, Chang C-Y, Clough T, Broudy D, Killeen T, MacLean B, et al. MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. *Bioinforma Oxf Engl.* 2014 Sep 1;30(17):2524–6.
162. Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Sep;404(4):939–65.
163. Liu H, Sadygov RG, Yates JR. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem.* 2004 Jul 15;76(14):4193–201.
164. Carvalho PC, Fischer JSG, Perales J, Yates JR, Barbosa VC, Bareinboim E. Analyzing marginal cases in differential shotgun proteomics. *Bioinforma Oxf Engl.* 2011 Jan 15;27(2):275–6.
165. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009 May 22;324(5930):1029–33.
166. Gallien S, Domon B. Detection and quantification of proteins in clinical samples using high resolution mass spectrometry. *Methods San Diego Calif.* 2015 Jun 15;81:15–23.
167. Fink M. Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 1997;110:87–95.
168. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009 Sep;9(9):609–17.
169. Newsholme P, Gordon S, Newsholme EA. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochem J.* 1987 Mar 15;242(3):631–6.
170. Newsholme P, Curi R, Gordon S, Newsholme EA. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochem J.* 1986 Oct 1;239(1):121–5.
171. Cheng S-C, Quintin J, Cramer RA, Shepardson KM, Saeed S, Kumar V, et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science.* 2014 Sep 26;345(6204):1250684.
172. Jantsch J, Chakravorty D, Turza N, Prechtel AT, Buchholz B, Gerlach RG, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008 Apr 1;180(7):4697–705.

173. Freshney RI. Defined Media and Supplements. In: Culture of animal cells a manual of basic technique and specialized applications. Wiley-Blackwell; 2010.
174. Halliwell B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J.* 2014 Jun;37(3):99–105.
175. Yassin J, Singer M. Fundamentals of oxygen delivery. *Contrib Nephrol.* 2007;156:119–32.
176. Hill JR, Kwon G, Marshall CA, McDaniel ML. Hyperglycemic levels of glucose inhibit interleukin 1 release from RAW 264.7 murine macrophages by activation of protein kinase C. *J Biol Chem.* 1998 Feb 6;273(6):3308–13.
177. Torres-Castro I, Arroyo-Camarena ÚD, Martínez-Reyes CP, Gómez-Arauz AY, Dueñas-Andrade Y, Hernández-Ruiz J, et al. Human monocytes and macrophages undergo M1-type inflammatory polarization in response to high levels of glucose. *Immunol Lett.* 2016;176:81–9.
178. American Diabetes Association. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2015 Jan;38 Suppl:S8–16.
179. DeForge LE, Kenney JS, Jones ML, Warren JS, Remick DG. Biphasic production of IL-8 in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human whole blood. Separation of LPS- and cytokine-stimulated components using anti-tumor necrosis factor and anti-IL-1 antibodies. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1992 Apr 1;148(7):2133–41.
180. Dietl K, Renner K, Dettmer K, Timischl B, Eberhart K, Dorn C, et al. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010 Feb 1;184(3):1200–9.
181. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg.* 1990 Feb;77(2):204–7.
182. Venet F, Tissot S, Debard A-L, Faudot C, Crampé C, Pachot A, et al. Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med.* 2007 Aug;35(8):1910–7.
183. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg.* 1993 Feb;80(2):205–9.
184. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol.* 2016 Nov;37(11):724–37.
185. Volk HD, Thieme M, Heym S, Döcke WD, Ruppe U, Tausch W, et al. Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst Mitt.* 1991 Feb;(88):208–15.

186. Miller RR, Lopansri BK, Burke JP, Levy M, Opal S, Rothman RE, et al. Validation of a Host Response Assay, SeptiCyte LAB, for Discriminating Sepsis from Systemic Inflammatory Response Syndrome in the ICU. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Oct 1;198(7):903–13.
187. Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol*. 2014 Jun;26(3):237–45.
188. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015 Jul;21(7):677–87.
189. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013 Dec;13(12):862–74.
190. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Dec 12;7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5149523/>
191. Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(6):345–60.
192. Gupta S, Lee C-M, Wang J-F, Parodo J, Jia S-H, Hu J, et al. Heat-shock protein-90 prolongs septic neutrophil survival by protecting c-Src kinase and caspase-8 from proteasomal degradation. *J Leukoc Biol*. 2018 May;103(5):933–44.
193. Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Apr;20(2):97–113.
194. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005 May;5(5):375–86.
195. Qiao Y, Giannopoulou EG, Chan CH, Park S-H, Gong S, Chen J, et al. Synergistic activation of inflammatory cytokine genes by interferon- γ -induced chromatin remodeling and toll-like receptor signaling. *Immunity*. 2013 Sep 19;39(3):454–69.
196. Braverman J, Sogi KM, Benjamin D, Nomura DK, Stanley SA. HIF-1 α Is an Essential Mediator of IFN- γ -Dependent Immunity to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016 15;197(4):1287–97.
197. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med*. 1997 Jun;3(6):678–81.
198. Dries DJ, Jurkovich GJ, Maier RV, Clemmer TP, Struve SN, Weigelt JA, et al. Effect of interferon gamma on infection-related death in patients with severe injuries. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch Surg Chic Ill 1960*. 1994 Oct;129(10):1031–41; discussion 1042.
199. Macintyre AN, Rathmell JC. PKM2 and the Tricky Balance of Growth and Energy in Cancer. *Mol Cell*. 2011 Jun 24;42(6):713–4.

200. Palsson-McDermott EM, Curtis AM, Goel G, Lauterbach MA, Sheedy FJ, Gleeson LE, et al. Pyruvate Kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction, and is a critical determinant of the Warburg Effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab.* 2015 Jan 6;21(1):65–80.
201. Geyer PE, Wewer Albrechtsen NJ, Tyanova S, Grassl N, Iepsen EW, Lundgren J, et al. Proteomics reveals the effects of sustained weight loss on the human plasma proteome. *Mol Syst Biol* [Internet]. 2016 Dec 22;12(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5199119/>
202. Zhang B, Käll L, Zubarev RA. DeMix-Q: Quantification-Centered Data Processing Workflow. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2016 Apr;15(4):1467–78.
203. Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2012 Jun;11(6):O111.016717.
204. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2008 Oct 14;4:222.

Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Não controle

Título: Adaptações Metabólicas na Sepsis: Mecanismos Fisiopatológicos e Impacto Sobre Desfechos Clínicos

Justificativa e objetivos

Durante as infecções graves, nosso organismo reage de forma a combater os microorganismos. No entanto essa reação, quando excessiva, pode ter efeitos prejudiciais. Este estudo visa entender melhor os fenômenos ligados às infecções graves e futuramente contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para estas infecções.

Proposta do estudo

O Sr(a) _____ está sendo convidado a participar deste estudo, para estudar a reação produzida pelo nosso organismo em resposta a infecções graves.

Explicação dos procedimentos

Será realizada coleta de sangue de 20 (vinte) ml, pelo cateter venoso profundo, linha arterial ou punção venosa periférica, utilizando-se material estéril e descartável. Este procedimento é semelhante à coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina. Haverá coleta nos dias 1 e 10 após início do estudo.

Após a análise inicial, estas amostras ficarão armazenadas por 48 meses, para eventuais necessidades de realização de novas dosagens e/ou análises. Estas amostras estarão sob a responsabilidade do coordenador do estudo, Dr. Fernando Augusto Bozza.

Benefícios

Pode haver benefícios com sua participação à medida que este estudo poderá ajudar a entender melhor os fenômenos ligados às infecções graves e futuramente contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para estas infecções. No entanto, os resultados dos testes realizados não serão utilizados diretamente na condução ou modificação de seu tratamento. Estes resultados estarão disponíveis apenas ao final do estudo e caso você tenha interesse em conhecer os seus resultados ou as conclusões do estudo pode entrar em contato com o coordenador do estudo, Dr. Fernando Augusto Bozza.

Desconfortos e riscos

Os desconfortos que podem ocorrer são aqueles relacionados a uma retirada normal de sangue para exame, como dor no local da punção venosa e formação de um hematoma local. Este estudo não implica em riscos, nem em qualquer modificação do tratamento empregado ou administração de medicamentos experimentais.

Participação voluntária no estudo

A participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar, bem como cancelar sua participação a qualquer momento do estudo. Esta decisão não afetará de nenhuma maneira os cuidados médicos que lhe serão oferecidos.

Confidencialidade

O seu nome não será mencionado em publicações ou relatórios produzidos para este estudo. Entretanto seu prontuário médico poderá ser consultado pelos profissionais envolvidos no estudo.

Armazenamento de amostras biológicas

O plasma será separado e armazenado em freezer -70°C ou tanque de nitrogênio líquido de acordo com procedimento operacional pré-definido no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), para posterior análise. As amostras serão processadas para detectar certas substâncias para a atual pesquisa. Se no futuro houver necessidade da dosagem de outras substâncias nestas amostras de soro, plasma e células, o paciente ou responsáveis serão contactados para nova avaliação e autorização para uso deste material.

Se você tem dúvidas

Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor, telefone para o Dr. Pedro Azambuja ou Dr. Fernando Bozza nos telefones 3865-9620 ou 2562-1311.

CONSENTIMENTO PARA A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A sua assinatura significa que você leu este formulário ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação no estudo.

Assinatura (Paciente)

Data

Se o paciente não é capaz de consentir:

A sua assinatura, como responsável legal ou familiar do paciente, significa que você leu este formulário ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação do paciente no estudo.

_____ não é capaz de dar o seu consentimento.

Nome do paciente (em letra de forma)

Nome do responsável legal ou familiar
(em letra de forma)

Grau de parentesco com o paciente

Assinatura (responsável legal ou familiar)

Data

Nome do membro da equipe de pesquisa (em letra de forma)

Assinatura (membro da equipe de pesquisa)

Data

Termo de Consentimento LIVRE E ESCLARECIDO – Controle

Título: Adaptações Metabólicas na Sepsis: Mecanismos Fisiopatológicos e Impacto Sobre Desfechos Clínicos

Justificativa e objetivos

Durante as infecções graves, nosso organismo reage de forma a combater os microorganismos. No entanto essa reação, quando excessiva, pode ter efeitos prejudiciais. Este estudo visa entender melhor os fenômenos ligados às infecções graves e futuramente contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para estas infecções.

Proposta do estudo

O Sr(a) _____ está sendo convidado a participar deste estudo, para estudar a reação produzida pelo nosso organismo em resposta a infecções graves.

Explicação dos procedimentos

Será realizada uma coleta de sangue de 20 (vinte) ml, pelo cateter venoso profundo, linha arterial ou punção venosa periférica, utilizando-se material estéril e descartável. Este procedimento é semelhante à coleta de sangue para exames laboratoriais de rotina.

Após a análise inicial, estas amostras ficarão armazenadas por 48 meses, para eventuais necessidades de realização de novas dosagens e/ou análises. Estas amostras estarão sob a responsabilidade do coordenador do estudo, Dr. Fernando Augusto Bozza.

Benefícios

Pode haver benefícios com sua participação à medida que este estudo poderá ajudar a entender melhor os fenômenos ligados às infecções graves e futuramente contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para estas infecções. No entanto, os resultados dos testes realizados não serão utilizados diretamente na condução ou modificação de seu tratamento. Estes resultados estarão disponíveis apenas ao final do estudo e caso você tenha interesse em conhecer os seus resultados ou as conclusões do estudo pode entrar em contato com o coordenador do estudo, Dr. Fernando Augusto Bozza.

Desconfortos e riscos

Os desconfortos que podem ocorrer são aqueles relacionados a uma retirada normal de sangue para exame, como dor no local da punção venosa e formação de um hematoma local. Este estudo não implica em riscos, nem em qualquer modificação do tratamento empregado ou administração de medicamentos experimentais.

Participação voluntária no estudo

A participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar, bem como cancelar sua participação a qualquer momento do estudo. Esta decisão não afetará de nenhuma maneira os cuidados médicos que lhe serão oferecidos.

Confidencialidade

O seu nome não será mencionado em publicações ou relatórios produzidos para este estudo. Entretanto seu prontuário médico poderá ser consultado pelos profissionais envolvidos no estudo.

Armazenamento de amostras biológicas

O plasma será separado e armazenado em freezer -70°C ou tanque de nitrogênio líquido de acordo com procedimento operacional pré-definido no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), para posterior análise. As amostras serão processadas para detectar certas substâncias para a atual pesquisa. Se no futuro houver necessidade da dosagem de outras substâncias nestas amostras de soro, plasma e células, o paciente ou responsáveis serão contactados para nova avaliação e autorização para uso deste material.

Se você tem dúvidas

Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor, telefone para o Dr. Pedro Azambuja ou Dr. Fernando Bozza nos telefones 3865-9620 ou 2562-1311.

CONSENTIMENTO PARA A PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A sua assinatura significa que você leu este formulário ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação no estudo.

Assinatura (Paciente)

Data

Se o paciente não é capaz de consentir:

A sua assinatura, como responsável legal ou familiar do paciente, significa que você leu este formulário ou que ele foi lido para você, que lhe foram dadas todas as explicações sobre o estudo, que você recebeu respostas para as suas dúvidas, está satisfeito com as informações que lhe foram dadas e concordou com a participação do paciente no estudo.

_____ não é capaz de dar o seu consentimento.

Nome do paciente (em letra de forma)

Nome do responsável legal ou familiar
(em letra de forma)

Grau de parentesco com o paciente

Assinatura (responsável legal ou familiar)

Data

Nome do membro da equipe de pesquisa (em letra de forma)

Assinatura (membro da equipe de pesquisa)

Data