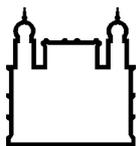


INSTITUTO OSWALDO CRUZ
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**EXPLORANDO OS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA
SEPSE ATRAVÉS DA ANÁLISE PROTEÔMICA DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES ISOLADAS DO PLASMA DE PACIENTES.**

LUANA ROCHA DA SILVA

Rio de Janeiro 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LUANA ROCHA DA SILVA

**EXPLORANDO OS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA SEPSE
ATRAVÉS DA ANÁLISE PROTEÔMICA DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES ISOLADAS DO PLASMA DE PACIENTES.**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Profa. Dra. Monique Ramos de Oliveira Trugilho
Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

Rio De Janeiro 2021

Silva, Luana Rocha da.

Explorando os mecanismos fisiopatológicos da sepse através da análise proteômica de vesículas extracelulares isoladas do plasma de pacientes. / Luana Rocha da Silva. - Rio de Janeiro, 2021.

146 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

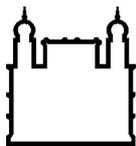
Orientadora: Monique Ramos de Oliveira Trugilho.

Co-orientador: Fernando Augusto Bozza.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Sepse e choque séptico. 2. Vesículas extracelulares. 3. Proteômica. 4. Perfis Moleculares. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LUANA ROCHA DA SILVA

EXPLORANDO OS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA SEPSE ATRAVÉS DA ANÁLISE PROTEÔMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ISOLADAS DO PLASMA DE PACIENTES.

Orientadores: Profa. Dra. Monique Ramos de Oliveira Trugilho
Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza

Aprovada em: 30/07/2021

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto (IOC/FIOCRUZ) - Presidente

Prof. Dra. Mariana Renovato Martins (UFF)

Prof. Dr. Eugênio Damaceno Hottz (UFJF)

Prof. Dra. Tatiana Maron-Gutierrez (IOC/FIOCRUZ) - Revisora e Suplente

Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto (IOC/FIOCRUZ) - Suplente

Rio de Janeiro, 30 de julho de 2021

Em memória de Ariane Rennó Brogliato
Nunca se está morto enquanto houver alguém que lembre de você.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus meu Criador, razão de todas as minhas ações. A minha família e amigos, que me dão suporte em todos os aspectos, apoiam minhas decisões e aos quais tenho o imenso prazer em compartilhar minhas conquistas.

Agradeço aos meus orientadores, Monique Trugilho e Fernando Bozza, por todo apoio e paciência em me auxiliar na elaboração desse trabalho e contribuir para minha formação. Ao Dr. Pedro Azambuja, por compartilhar do conhecimento de modo tão eficaz, e que colaborou significativamente em todas as etapas do trabalho.

Agradeço aos integrantes do laboratório de toxinologia. de modo especial, ao Dr. Richard pela colaboração direta na execução desse trabalho, e todos os integrantes do laboratório de imunofarmacologia, profissionais e estudantes incríveis e competentes.

Também agradeço imensamente ao laboratório Pensabio de São Paulo, e todos os seus integrantes pela experiência maravilhosa e muito proveitosa, que permitiu concluir uma etapa fundamental da análise feita nesse trabalho, ao possibilitar o uso do equipamento NanoSight NS300 e prestar todo o auxílio técnico para tal.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1.Introdução.....	20
1.1. A Definição de Sepsis	21
1.2. Epidemiologia	24
1.3. Aspectos Clínicos e Fatores de Risco.....	26
1.4. Fisiopatologia.....	28
1.4.1. A Resposta Imune	28
1.4.2. Alterações da Microcirculação e do Metabolismo Energético no Estabelecimento das Disfunções Orgânicas.	30
1.4.3. A Comunicação Celular na Resposta Imune.....	33
1.5. Vesículas Extracelulares	34
1.5.1. Classificação e Características das Vesículas Extracelulares.....	34
1.5.2. Histórico	37
1.5.3. O Papel das Vesículas Extracelulares na Sepsis	39
1.5.4. Abordagens Metodológicas de Larga Escala no Estudo das Vesículas Extracelulares	42
2. Justificativa.....	46
3. Objetivos	48
3.1. Geral.....	49
3.2. Específicos	49
4. Metodologia.....	50
4.1. Coorte e critérios de inclusão e exclusão das amostras	51
4.2. Padronização do Isolamento de Vesículas Extracelulares (VEs):.....	51
4.2.1. Preparo das amostras de plasma	52
4.2.2. Ultracentrifugação com gradiente de densidade bifásico (UG).....	53
4.2.3. Centrifugações seriadas (CS)	53
4.2.4. Cromatografia de exclusão molecular (SEC – <i>size exclusion chromatography</i>). 53	53
4.2.5. Detecção das EVs entre as frações da SEC	54
4.3. Isolamento das VEs das amostras clínicas	55
4.4. Quantificação e determinação de tamanho das VEs por NTA.....	55
4.5. Preparo das amostras para espectrometria de massas.....	55
4.6. Nanocromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (nLC– MS/MS).....	56
4.7. Análise Computacional I – Identificação, Quantificação E Classificação Molecular Do Proteoma Das VEs.	59

4.7.1. Identificação dos peptídeos e inferência das proteínas.....	59
4.7.3. Quantificação <i>label-free</i> por <i>Spectral Counting</i> – Distribuição Das Proteínas E Diferença De Abundância Entre Os Grupos De Análise.....	60
4.8. Análise Computacional II – Inferência Sobre Mecanismos Biológicos.....	61
5. Resultados	63
5.1. Características da Coorte.....	64
5.1.1 Desempenho das Técnicas de Isolamento das VEs do Plasma.	64
5.1.2 Reprodutibilidade das cromatografias realizadas nas amostras dos grupos de análise.	70
5.1.3 Quantidade e tamanho das partículas analisadas entre as amostras dos grupos de análise.....	71
5.1.4 Concentração de Proteínas Recuperadas Após a Lise das VEs.....	75
5.2. Análise Proteômica	77
5.2.1. Identificações das proteínas no ambiente computacional PatternLab for Proteomics 4.0.....	78
5.2.2. Análise Diferencial do Proteoma Identificado Entre os Grupos de Análise	80
5.2.3 Análises de enriquecimento de componentes celulares do proteoma de VEs	85
5.3 Análises de enriquecimento de vias das proteínas identificadas diferencialmente no proteoma de VEs.	88
5.3.1 Controle vs Pacientes.....	89
5.3.2 Sepse vs Choque.....	91
5.4 Análises com redes de interação proteína-proteína (PPI).....	93
5.5 Mapeamento das Proteínas Envolvidas na Ativação Plaquetária e Degranulação de Neutrófilos.....	98
6. Discussão	100
7. Conclusões.....	123
REFERÊNCIAS	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios atuantes na resposta imune	30
Figura 1.2 - Alterações do endotélio vascular e seus impactos na fisiopatologia da sepse	32
Figura 1.3 - A comunicação celular equilibrada como aspecto crucial no desfecho resolutivo da resposta imune	33
Figura 1.4 - Características gerais e biogênese das vesículas extracelulares.....	35
Figura 1.5 - Biomoléculas comuns encontradas nas Vesículas Extracelulares	36
Figura 1.6 - Ações protetoras e prejudiciais das vesículas extracelulares circulantes...42	
Figura 1.7 - Publicações que abordaram a proteômica ou transcriptômica no estudo das VEs	43
Figura 4.1 – Fluxograma dos experimentos realizados na etapa de padronização do isolamento de VEs do plasma	52
Figura 4.2 - Fluxo de trabalho da abordagem proteômica <i>shotgun</i>	58
Figura 4.3 – Montagem da lista de proteínas diferencialmente abundantes.....	61
Figura 5.1 - Perfil de eluição de 1,0 mL de plasma de doador saudável.....	66
Figura 5.2 - Perfil de eluição de 1,0 mL de plasma de doadores saudáveis em coluna reutilizada ou em coluna nova.....	67
Figura 5.3 - Número de espectros referentes a albumina e apolipoproteínas.....	68
Figura 5.4 – Desempenho das metodologias testadas para o isolamento de VEs das amostras experimentais.....	70
Figura 5.5 – Perfil cromatográfico de 0,4 mL de plasma submetidos a SEC.....	71
Figura 5.6 - Valores individuais das concentrações de VEs por mL entre as amostras analisadas.....	72
Figura 5.7 – Distribuição das faixas de tamanho das partículas quantificadas entre as amostras dos grupos de análise	74
Figura 5.8 - Valores de individuais de VEs por mL entre os grupos Controle, Sepse e Choque	75
Figura 5.9 - Comparação da quantidade de VEs/ μ L e a concentração proteica obtida em μ g/ μ l por amostra entre os grupos de análise	77
Figura 5.10 – Representação das correntes iônicas totais (Total Ion Current - TIC) e número absoluto de peptídeos identificados por amostra	78
Figura 5.11 – Distribuição de todas as proteínas identificadas com confiabilidade estatística (FDR <1) entre os grupos de análise	79

Figura 5.12 – Proteínas compartilhadas e exclusivas entre os grupos de análise.....	80
Figura 5.13 - Análise T-fold para determinação das diferenças de abundância entre as proteínas compartilhadas.....	81
Figura 5.14 – Gráficos MDP ou Grau de Perturbação Molecular.....	82
Figura 5.15 – <i>Heatmap</i> representativo das proteínas diferencialmente abundantes.....	82
Figura 5.16 – Proteínas de maior abundância relativa no proteoma, segundo o valor de NSAF.....	84
Figura 5.17 - Análise de enriquecimento das listas de proteínas dos grupos controle, sepse e choque, baseados no banco de dados do Gene Ontology.....	86
Figura 5.18 - Diagrama de Venn das comparações entre as proteínas do Vesiclepedia e as identificadas no proteoma de VEs.....	87
Figura 5.19 - Mapa de enriquecimento de vias das proteínas exclusivas e diferencialmente abundantes dos pacientes.....	90
Figura 5.20 - Mapa de enriquecimento de vias das proteínas exclusivas e diferencialmente abundantes do grupo Controle.....	91
Figura 5.21 - Mapa de enriquecimento de vias das proteínas exclusivas e diferencialmente abundantes do grupo Sepse.....	92
Figura 5.22 – Mapa de enriquecimento de vias das proteínas exclusivas e diferencialmente abundantes do grupo Choque.....	93
Figura 5.23 - Rede de interação proteína-proteína com as identificações relativas ao grupo de amostras clínicas.....	94
Figura 5.24 - Proteínas associadas a ativação plaquetária e degranulação de neutrófilos, entre os grupos de análise.....	99
Figura 6.1 – Ilustração do papel funcional das proteínas identificadas no proteoma de VEs dos Pacientes envolvidas na Adesão seguido da Ativação Plaquetária.....	111
Figura 6.2 - Ilustração do papel funcional das proteínas identificadas no proteoma de VEs dos Pacientes, envolvidas no recrutamento e degranulação de neutrófilos.....	112
Figura 6.3 - Ilustração do papel funcional das proteínas identificadas no proteoma de VEs dos Pacientes envolvidas na ativação do Sistema Complemento.....	114
Figura 6.4 - Ilustração do papel funcional das proteínas identificadas no proteoma de VEs dos Pacientes envolvidas Interação Célula-Célula e na Migração de leucócitos.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Critérios para Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica	21
Tabela 1.2 - Escore clínico SOFA	23
Tabela 1.3 – Dados internacionais e nacionais sobre incidência e mortalidade da sepse.	25
Tabela 1.4 – Breve histórico das VEs no campo da pesquisa	39
Tabela 5.1 – Relação dos pacientes e controles com suas respectivas características, sítios de infecção, gravidade e desfecho	64
Tabela 5.2 - Resultados da análise proteômica de VEs isoladas por CS em testes prévios.	65
Tabela 5.3 – Números absolutos dos dados da análise proteômica das frações da SEC.....	68
Tabela 5.4 - Número de peptídeos identificados e proteínas inferidas na análise proteômica de VEs isoladas pelos 4 métodos testados.....	69
Tabela 5.5 – Relação das concentrações proteicas obtidas	76
Tabela 5.6 – Números absolutos de espectros, peptídeos, e proteínas, obtidos após as análises no ambiente computacional PatternLab	79
Tabela 5.7 – Resultados da etapa de quantificação do proteoma de VEs dentre os grupos de análise.....	89
Tabela 5.8 – Relação dos principais nós da rede de P.P.I. do grupo pacientes, o valor da interação e a descrição resumida das proteínas.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS

A2M – Alfa 2 Macroglobulina.

ACN – Acetonitrila

ACTN – Actina.

ADAM10 – do inglês: ADAM Metallopeptidase Domain 10 (Domínio 10 de Metalopeptidase).

ALDOA – Aldolase A.

ANPEP - Alanil Aminopeptidase.

ANX – Anexina.

APC – do inglês: Antigen-Presenting Cell (Células Apresentadoras de Antígenos).

APP – do inglês: Amyloid-beta Precursor Protein (Proteína Precursora Amiloide)

ARPC5 – do inglês: Actin-related protein 2/3 complex subunit 5.

ATP – do inglês: Adenosine TriPhosphate (Adenosina Trifosfato).

BIN – do inglês: Bridging Integrator (Integrador de Ponte).

BSG – Basigina.

C1QC - Subunidade C1q do Complemento.

C4BPB - Cadeia Beta da Proteína de Ligação a C4b.

CALM – Calmodulina

CAP – do inglês: Adenylyl cyclase-associated protein (Proteína associada à adenilil ciclase).

CD – do inglês: Cluster of Differentiation (Grupamento de Diferenciação).

CDC42 – do inglês: Cell Division Cycle 42 (Homólogo Da Proteína 42 De Controle Da Divisão Celular).

CFHR5/CFH – do inglês: Complement Factor H Related 5 (Fator H do Complemento).

CFL1 – Cofilina 1

CFP – do inglês: Complement Factor Properdin (Properdina).

CID – Coagulação Intravascular Disseminada.

CLDN – Claudina.

CLP – do inglês: Cecal Ligation and Puncture (Ligadura e Punção Cecal).

CLU - Clusterina

COL – Colágeno.

CPNE – Copina.

CRP – do inglês: C-reactive protein (Proteína C Reativa).

CSF – do inglês: Colony Stimulating Factor 1 (Fator 1 Estimulador de Colônias).

CTSG – Catepsina G

CXCL7 – do inglês: Chemokine (C-X-C motif) ligand 7 (Ligante 7 de quimiocina C-X-C).

DAMPs – do inglês: Damage-associated molecular patterns (Padrões Moleculares Associados a Danos).

DTT – Ditioneitol.

EDTA – do inglês: Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido Etilenodiamino Tetraacético).

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio.

ESCRT – do inglês: Endosomal Sorting Complex Required for Transport.

F10 - Fator 10 da Coagulação.

F13B – Cadeia Beta Do Fator 13 Da Coagulação.

F8 – Fator 8 da Coagulação.

F9 - Fator 9 da Coagulação.

FA – do inglês: Formic Acid (Ácido Fórmico).

FBLN - Fibulina

FCER1G – do inglês: Fc Fragment Of IgE Receptor Ig (Fragmento Fc de IgE).

FDR – do inglês: False Discovery Rate (Taxa de Falsas Descobertas).

FG – Fibrinogênio.

FiO2 – Fração de Oxigênio Inspirado.

FLNA – Filamina.

fMLP – N-formil-l-metionil-l-leucil-fenilalanina.

FYN - Tirosina Quinase de Fyn.

GBD - do inglês Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (Estudo Sobre a Carga Global de Doenças, Lesões e Fatores de Risco).

GNAI2 – do inglês: G Protein Subunit Alpha I2 (Subunidade Alfa I2 da Proteína G).

GNAI3 – do inglês: G Protein Subunit Alpha I2 (Subunidade Alfa I3 da Proteína G).

GNB – do Inglês: Guanine nucleotide-binding (Subunidade Da Proteína G).

GP – do inglês: Glycoprotein (Glicoproteína).

GSTP - Glutathione S-transferase P.

HDL – do inglês: High-density lipoprotein (Lipoproteína De Alta Densidade).

HLA – do inglês: Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano).

HRG – do inglês: Histidine-Rich Glycoprotein (Glicoproteína Rica em Histidina).

HSP – do inglês: Heat Shock Protein (Proteína do Choque Térmico).

HUVEC - do inglês: Human umbilical vein endothelial cells (células endoteliais de veia umbilical humana).

IAA – Iodoacetamida.

ICAM-1 – do inglês: Intercellular Adhesion Molecule 1 (Molécula De Adesão Intercelular 1)

IFN – Interferon.

IL – Interleucina.

ILAS – Intitulo Latino Americano de Sepse.

ILK – do inglês: Integrin Linked Kinase (Quinase ligada à integrina)

ISEV – do inglês: International Society of Extracellular Vesicles (Sociedade internacional de Vesículas Extracelulares).

ITG – Integrina.

JAM-A – do inglês: Junctional Adhesion Molecule A (Molécula de Adesão Juncional A).

KBr - Brometo de potássio.

KLKB - Calicreína Plasmática.

LAM – Laminina.

LC – do inglês: Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida)

LDL – do inglês: Low-density Lipoprotein (Lipoproteínas de densidade baixa).

LTBP – Latent-Transforming Growth Factor Beta-Binding Protein (Proteína de Ligação Beta 1 do Fator de Crescimento Transformador Latente).

LYN – Tirosina Quinase Lyn.

MAC1 – do inglês: Macrophage-1 antigen (Antígeno do Macrófago-1)

MASP1 – do inglês: Mannan-Binding Lectin Serine Protease (Lectina serina protease 1)

MDP – do inglês: Molecular Degree of Perturbation (Grau de Perturbação Molecular).

MHC – do inglês: Major Histocompatibility Complex (complexo principal de histocompatibilidade)

miRNA – do inglês: Micro Ribonucleic acid (Micro Ácido ribonucleico).

MME – do inglês: Membrane Metalloendopeptidase (Metaloendopeptidase).

MMP – Metalopeptidase.

MMRN – Multimerina

MS – do inglês: Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas).

MVs – Microvesículas

NF- κ B – do inglês: Nuclear Fator κ B (Fator Nuclear κ B).

NID – Nidogênio.

NLRP3 – do inglês: NOD- LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (O domínio pirina da família NLR contendo 3).

NOD-like – do inglês: Nucleotide-binding and Oligomerization Domain (Receptores Similares ao Domínio de Oligomerização Ligante de Nucleotídeo).

NSAF – do inglês: Normalized Spectral Abundance Factor (Fator de abundância espectral normalizado).

NTA – do inglês: Nanoparticles Tracking Análises (Análise de rastreamento de nanopartículas)

OLFM4 – Olfactomedina 4

P4HB – do inglês: Prolin 4-hydroxylase (Prolin-4-hidroxilase).

PAM – Pressão Arterial Media.

PAMPs – do inglês: Pathogen-Associated Molecular Pattern (Padrões Moleculares Associados a Patógenos).

PaO₂ - Pressão Arterial de Oxigênio.

PBS - do inglês: Phosphate-Buffered Saline (Salina Tamponada Fosfatada).

PDGF – do inglês: Platelet-Derived Growth Factor (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas).

PFN1 – do inglês: Profilin1 (Profilina).

PKM – Piruvato quinase PKM

PLEK – do inglês: Pleckstrin (Plequistina).

PNP - Purina Nucleosídeo Fosforilase.

PPI - Peptidilprolin isomerase

PRS – Serina Protease (Tripsina).

PSGL-1 – do inglês: P-selectin glycoprotein ligand-1 (Ligante 1 da Glicoproteína P-Selectina)

PSM – do inglês: Peptide-Spectrum Match (Combinação De Espectro De Peptídeo).

PTPRC – Proteína Tirosina Fosfatase, Tipo Receptor C

RABs – do inglês: Ras-related proteins RAB.

RAC – do inglês: Rac Family Small GTPase (Pequenas Rho GTPases).

RAP1B – Proteína Rap-1b relacionada à Ras.

RETN – Resistina.

RHOA – Ras Homolog Family Member A (Membro Da Família De Homologo A Ras).

RSU - do inglês: Ras Suppressor Protein (Proteína Supressora de Ras)

SDC – Sindecano.

SEC – do inglês: Size Exclusion Chromatography (Cromatografia de Exclusão Molecular)

SELP – P-Selectina.

SIRS - do inglês: Systemic Inflammatory Response Syndrome (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica).

SOD - Superóxido Dismutase.

SOFA - do inglês: Sepsis Related Organ Failure Assessment (Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos).

SPARC – do inglês: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (Proteína Secretada Ácida e Rica em Cisteína).

SPREAD – do inglês: Sepsis PREvalence Assessment Database (Banco de dados de avaliação de prevalência de sepse).

SRGN – Serglicina.

STOM – do inglês: Stomatin (Estomatina).

SUS - Sistema Único de Saúde.

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TCR – do inglês: T Cell Receptor (Receptor de Células T)

TFA – do inglês: Trifluoroacetic Acid (Ácido Trifluoroacético).

TIC – do inglês: Total Ion Current (Corrente total iônica).

TLN – Talina

TLR – do inglês: Toll Like Receptor (Receptor do Tipo Toll).

TNF - do inglês: Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral).

TSG101 – do inglês: Tumor Susceptibility Gene 101

TUBA - Tubulina

UTI – Unidade de Terapia Intensiva.

VCAM – do inglês: Vascular Adhesion Molecule 1 (Molécula De Adesão Vascular 1)

VCAN – Versicano.

VCL – Vinculina

VCP – do inglês: Valosin-Containing Protein (Proteína Contendo Valosina).

VEs – Vesículas Extracelulares

VLDL – do inglês: Very low-density lipoprotein (Lipoproteínas de densidade muito baixa)

VTN – Vitronectina.

VWF – Fator de von Willebrand

WDR – do inglês: WD Repeat Domain 1 (Domínio de repetição WD)

RESUMO

A sepse é a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva no Brasil e uma das condições de maior ônus econômico por pacientes hospitalizados. Atualmente a sepse é definida como disfunção orgânica potencialmente fatal, decorrente de uma resposta imune desregulada frente a uma infecção. Sua forma mais grave, o choque séptico, ocorre na presença de profundas anormalidades circulatórias e do metabolismo celular, aumentando o risco de morte. Durante a resposta imune, a sinalização celular é fundamental na coordenação de um desfecho resolutivo. Recentemente, a comunicação intercelular, via secreção e captação de vesículas extracelulares (VEs) pelas células efetoras da resposta imune, passou a ser explorado no contexto da sepse. As VEs são estruturas que contêm biomoléculas, diretamente relacionadas às suas células de origem. Metodologias voltadas para análises globais de biomoléculas, como a proteômica, possibilitam a identificação e interpretação de perfis moleculares associados às condições clínicas, contribuindo na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos complexos como a sepse. O presente trabalho, consiste na aplicação da abordagem proteômica *shotgun*, para análise exploratória de VEs isoladas do plasma de pacientes com sepse e choque séptico, comparados aos de indivíduos saudáveis. Para tal, diferentes métodos de isolamento das VEs foram testados, e demonstramos que a cromatografia de exclusão molecular (SEC do inglês: *Size Exclusion Chromatography*) é a técnica mais adequada para o isolamento de VEs do plasma, voltado para análise proteômica. A quantificação relativa das VEs isoladas por SEC, nas amostras dos grupos experimentais, demonstrou que, apesar da concentração de VEs ser heterogênea, entre amostras do mesmo grupo de análise, as amostras do grupo choque, possuem a média de concentração mais elevada, comparado aos grupos sepse e controle. Porém, o tamanho relativo da maioria das VEs analisadas permaneceu entre 50 e 150 nm, e essa característica foi observada em todos os grupos de análise. Após a análise proteômica das VEs isoladas de amostras de pacientes (sepse + choque séptico) e controles, confirmamos a presença de proteínas comumente identificadas em trabalhos de análise de VEs do plasma como: Anexinas; Tetraspaninas; Enzimas Glicolíticas; Pequenas GTPases, Componentes do citoesqueleto, entre outros. A análise quantitativa (por *spectral counting* - SC) demonstrou diferenças entre o proteoma das VEs das amostras de pacientes e controles. Proteínas identificadas diferencialmente no grupo de pacientes, estão associadas a um perfil pró-inflamatório e pró-trombótico, especialmente envolvidos na ativação plaquetária, nas interações celulares associadas a modulação da barreira endotelial e na transmigração celular, bem como na degranulação de neutrófilos. As proteínas diferencialmente abundantes, quando comparamos os grupos sepse e choque séptico, estão relacionadas principalmente à via de degranulação de neutrófilos, enriquecida no grupo choque séptico, indicando um possível perfil molecular associado a gravidade. A caracterização do proteoma de VEs de pacientes com sepse e choque séptico, contribuiu com informações que permitem compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na desregulação da resposta imune, sob uma nova perspectiva, onde as VEs, através do seu conteúdo molecular, podem modular a resposta imune e os mecanismos associados ao estabelecimento da sepse.

ABSTRACT

Sepsis is the leading cause of death in intensive care units in Brazil and one of the conditions with the highest economic burden for hospitalized patients. Currently, sepsis is defined as “potentially fatal organ dysfunction, resulting from a deregulated immune response to an infection”. Its most severe form, septic shock, occurs in the presence of profound circulatory and cell metabolism abnormalities, increasing the risk of death. During the immune response, cell signaling is essential in coordinating a resolving outcome. Recently, intercellular communication, via secretion and uptake of Extracellular Vesicles (EVs) by immune response cells, has been explored in the context of sepsis. EVs contain biomolecules, related to their cells of origin. Thereby, methodologies aimed a large analysis of biomolecules, such as proteomics, enable the identification and interpretation of molecular profiles, contributing to the understanding of complex pathophysiological mechanisms such as sepsis. The present work consists in the application of proteomics *shotgun* approach for an exploratory analysis, in EVs isolated from plasma samples of patients with sepsis and septic shock, compared to healthy individuals. To this end, different methods of EVs isolation were tested, and we demonstrated that Size Exclusion Chromatography (SEC) is the most suitable technique for isolating EVs from plasma, aimed proteomic analysis. The relative quantification of EVs isolated by SEC, in the samples of the experimental groups, showed that, despite the concentration of EVs being heterogeneous, among samples from the same analysis group, the samples from shock group have the highest mean concentration compared to sepsis and control. However, the relative size of most EVs analyzed remained between 50 and 150 nm, and this characteristic was observed in all analysis groups. After proteomic analysis of EVs isolated from samples of patients (sepsis + septic shock) and controls, we confirmed the presence of proteins commonly identified in studies of EVs from plasma, such as: Annexins; Tetraspanins; Glycolytic Enzymes; Small GTPases, Cytoskeleton Components, among others. Quantitative analysis (by spectral counting - SC) showed differences between the EVs proteome of patient and control samples. Proteins differentially identified in the patient group are associated with a pro-inflammatory and pro-thrombotic profile, especially involved in platelet activation, in cell interactions associated with modulation of the endothelial barrier and cell transmigration, as well as in neutrophil degranulation. The differentially abundant proteins, when comparing the sepsis and septic shock groups, are mainly related to the neutrophil degranulation pathway, enriched in the septic shock group, indicating a possible molecular profile associated with gravity. The characterization of EVs proteome from patients with sepsis and septic shock provided information that allowed us to understand the pathophysiological mechanisms involved in the dysregulation of the immune response, from a new perspective, where EVs, through their molecular content, can modulate the immune response and the mechanisms associated with sepsis

1.Introdução

1.1. A Definição de Sepsis

O termo sepsis (*sêpsis*), foi mencionado pela primeira vez em escrituras da Grécia antiga, citada nos poemas de Homero, derivada da forma verbal *sepo*, que significa “apodrecer”, bem como nas obras de Hipócrates, que se referia a sepsis como a deterioração biológica perigosa que poderia ocorrer no corpo (1,2). Apesar das referências ao termo serem datadas de milhares de anos atrás, a definição de sepsis permanece alvo de debates e atualizações, conforme avanço na compreensão da fisiopatologia envolvendo essa grave condição clínica (3).

A definição atual da sepsis evoluiu com base nos avanços da compreensão do processo infeccioso, como as descobertas acerca da causa das infecções, decorrentes da invasão de micro-organismos vivos (4). Em 1914 o conceito moderno foi introduzido por Hugo Schottmuller, propondo que a “septicemia” é um estado de invasão de micro-organismos na corrente sanguínea, causando os sinais de doença, e décadas depois, Lewis Thomas introduz o conceito de que, a resposta ao micro-organismo causaria tal síndrome (5). Somente em 1989, através do trabalho de Bone e colaboradores, o conceito de ‘síndrome séptica’ foi adotado, como processo resultante da resposta imune sistêmica na suspeita ou presença confirmada de infecção (6). Tal conceito foi a base para a primeira definição moderna, resultante da conferência Norte Americana realizada no ano de 1991, onde a definição de sepsis foi estabelecida como a presença da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS do inglês: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) do hospedeiro na presença de uma infecção. Os critérios para determinação de SIRS compreendem a avaliação de quatro sinais clínicos: temperatura; ritmo cardíaco; ritmo respiratório e contagem de células brancas no sangue, e o preenchimento de dois desses critérios configura a presença da SIRS (Tabela 1.1) (7).

Tabela 1.1 - Critérios para Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica: presença de dois ou mais critérios. FR: frequência respiratória; ipm: incursões por minuto; bpm: batimentos por minuto.

Febre ou hipotermia ($> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$).

Taquipneia (FR > 20 ipm) ou hiperventilação ($\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg).

Frequência cardíaca > 90 bpm.

Leucocitose ou leucopenia (Leucometria total $> 12,000$ cu/mm ou < 4000 cu/mm), ou presença de neutrófilos imaturos (“bastões”) $> 10\%$ do total.

Nesse modelo, o termo “sepse grave” se atribui aos pacientes que preenchem os critérios de sepse, e que são acometidos por disfunção orgânica, enquanto os pacientes que progridem para o quadro de manifestação mais grave, caracterizada por hipotensão arterial persistente, configuram o choque séptico (7). Ainda que esses conceitos tenham sido a base da definição moderna de sepse, foram observados alguns obstáculos práticos onde, resumidamente, muitos pacientes em quadros agudos atendem aos critérios SIRS, o que, na prática, tornaria a sepse um equivalente de infecção (8).

Tais limitações levaram os especialistas à segunda conferência internacional, realizada em 2001 com objetivo de fornecer uma estrutura conceitual e prática para definir a resposta inflamatória sistêmica à infecção (9). A inclusão de sinais como, estado mental alterado, oligúria, diminuição do enchimento capilar e hiperglicemia sem diabetes, foi proposta com intuito de facilitar o reconhecimento da sepse e seus sintomas clínicos. Nessa conferência, também foi proposto que a caracterização da síndrome considerasse os fatores de predisposição relacionados ao paciente; a natureza da infecção, as características da resposta a infecção e a extensão da disfunção orgânica resultante (9). Porém, mesmo com a avaliação de novos critérios, a conferência não resultou em atualizações concretas para melhorias na definição da sepse e seus critérios clínicos, que permaneceram pouco esclarecidos (10).

Com a necessidade de uma definição prática e consolidada, somado ao avanço na coleta e manuseio de dados clínicos, um terceiro consenso foi realizado em 2016, o Sepsis-3, resultante de uma série de encontros com a presença de profissionais das áreas de cuidados intensivos, doenças infecciosas, cirúrgicas e pulmonares (11). Desse encontro, foram estabelecidos os atuais critérios e definições de sepse e choque séptico, com base em características fisiopatológicas, desse modo, a sepse é atualmente definida como a presença de disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma desregulação da resposta imune frente a uma infecção. Por sua vez, entende-se como choque séptico, um subgrupo mais grave, que ocorre na presença de hipotensão arterial persistente e anormalidades do metabolismo celular (11).

Como resultado da ‘força tarefa Sepsis-3’, ficou estabelecido como critério diagnóstico de disfunções orgânicas relacionadas à sepse, a utilização do escore clínico de Avaliação De Falência Orgânica Relacionada à Sepse (SOFA do inglês: *Sepsis Related Organ Failure Assessment*), já utilizado na avaliação da incidência e gravidade da disfunção orgânica, em pacientes graves nas unidades de terapia intensiva (12). A determinação da disfunção orgânica ocorre a partir de uma variação de dois pontos no

escore, que avalia os seguintes aspectos: Respiração; a coagulação; o sistema hepático; o sistema cardiovascular; o sistema nervoso central e o sistema renal (11), como demonstrado na tabela abaixo (Tabela. 1.2).

Tabela 1.2 - Escore clínico SOFA (12), utilizado nas unidades de terapia intensiva para o diagnóstico das disfunções orgânicas relacionadas à sepse. PaO₂: pressão parcial do oxigênio no sangue arterial; FiO₂: fração inspirada de oxigênio, PAM: pressão arterial média.

Avaliação do Sistema	Pontuação				
	0	1	2	3	4
PaO ₂ /FiO ₂	≥ 400	< 400	< 300	< 200 (com suporte ventilatório)	< 100 (com suporte ventilatório)
Plaquetas (x 10 ³ μL)	≥ 150	<150	<100	<50	<20
Bilirrubina (mg/dL)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,00 – 5,9	6,00 – 11,9	>12
Pressão (PAM)	PAM ≥ 70 mm Hg	< 70 mm Hg	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
Escala de coma Glasgow	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Creatinina (mg/dL) e/ou diurese (mL/dia)	<1,2	1,2 – 1,9	2,0 - 3,4	3,5 - 4,9, ou < 500mL/dia	> 5,0, ou < 200mL/dia

As novas definições e critérios de diagnósticos também apresentam algumas limitações relevantes, como apontado no próprio documento Sepsis-3, reconhecendo que a sepse permanece com ausência de critérios e características biológicas, de imagem ou de laboratório que identifique exclusivamente um paciente séptico (11).

1.2. Epidemiologia

Mesmo com dificuldades na coleta de dados epidemiológicos globais, os números subestimados de incidência e mortalidade da sepse são mundialmente elevados, o que a torna um problema de saúde pública, classificada como uma prioridade global pela Assembleia Mundial da Saúde e a Organização Mundial da Saúde em 2017 (13). A sepse é regularmente considerada o caminho que leva ao óbito, sendo documentado como causa da morte a infecção que levou ao quadro séptico, o que prejudica a acurácia dos dados globais (14).

Dados do estudo epidemiológico de Fleischmann e colaboradores (15), estimam que, mundialmente, a sepse afeta mais de 30 milhões de pessoas a cada ano, levando aproximadamente 5 milhões a óbito. Tais estimativas foram projetadas a partir da análise de dados gerados de adultos com sepse, tratados em hospitais de países desenvolvidos como: Estados Unidos, Alemanha, Austrália, Taiwan, Noruega, Espanha e Suécia (15). Entretanto, apenas 13% da população mundial vive em países desenvolvidos, tornando esta estimativa global desafiadora, visto que, fatores como assistência médica e programas inadequados de higiene e saúde pública, podem alterar expressivamente o cenário epidemiológico de uma região para outra (16).

Recentemente, Rudd e colaboradores (17) utilizaram dados de Carga Global de Doenças (GDB do inglês: *Global Burden of Diseases*) de 2017, estudo sobre a carga global de doenças, lesões e fatores de risco, considerada a avaliação para análise epidemiológica global mais abrangente em todo o mundo, até o momento. Como resultado, a estimativa de incidência de sepse foi de 48,9 milhões de casos ao ano e a mortalidade ficou próxima dos 11 milhões de óbitos ao nível global, sendo praticamente o dobro do que se concluiu no trabalho de Fleischmann em 2015. Essa discrepância reafirma a importância da inclusão de dados oriundos de países menos desenvolvidos para uma análise global, assim como fortalece a urgência no enfrentamento da sepse mundialmente (17).

No âmbito nacional, o estudo observacional de Machado e colaboradores, Banco de Dados de Avaliação de Prevalência da Sepse (SPREAD do inglês: *Sepsis PREvalence Assessment Database*) (18), indicou que a prevalência da sepse atingiu 36,7% dos pacientes avaliados (794 de 2.632) e a mortalidade foi próxima de 55,7% (439 óbitos em um total de 788 pacientes com sepse). A partir dos dados coletados, os autores projetaram uma incidência estimada em aproximadamente 420.000 casos por ano em adultos, dos

quais 230.000 vão a óbito ainda no hospital. Também foi observado nesse estudo, que aproximadamente 30% dos leitos das unidades de terapia intensiva (UTIs) brasileiras são ocupados por pacientes com sepse (18).

Em outro estudo epidemiológico nacional (19), foram coletadas informações da base de dados hospitalares do Sistema Único de Saúde (SUS), entre 2006 e 2015. Dos 96.570.859 registros obtidos, 724.458 foram relacionados a internações com diagnóstico primário de sepse. Nessa abordagem a incidência foi de 47,4/100.000 pessoas por ano em 2015, apresentando um aumento expressivo de mais de 50% em relação ao ano de 2006 onde a incidência era de 31,5/100.000. No mesmo período avaliado, a mortalidade teve um aumento de 85,0%, passando de 13,3/100.000 em 2006 para 24,6/100.000 pessoas por ano em 2015 (19).

Tabela 1.3 – Dados internacionais e nacionais sobre incidência e mortalidade da sepse.

	Projeção do número de acometidos/ano.	Projeção do número de óbitos/ano.
<i>Dados epidemiológicos globais:</i>		
Fleischmann <i>et al.</i> , Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. 2016. (15)	30 milhões	5 milhões
Rudd <i>et al.</i> , Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. (17)	48,9 milhões	11 milhões
<i>Dados epidemiológicos nacionais:</i>		
Machado <i>et al.</i> , The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): An observational study. 2017. (18)	420.000	230.000 (hospitalar)
Quintano e Neira <i>et al.</i> Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian	47,4/100.000	24,6/100.000

1.3. Aspectos Clínicos e Fatores de Risco

A disfunção orgânica associada a sepse, é causada pela desregulação da resposta imune à uma infecção (11). As consequências do desequilíbrio, entre mediadores pró e anti-inflamatórios, pode alterar a funcionalidade de teoricamente qualquer órgão/sistema, resultando em consequências graves como a própria disfunção. Na rotina clínica, seis sistemas principais - cardiovascular, respiratório, renal, neurológico, hematológico e hepático - podem ser monitorados, por observações e testes clínicos como os descritos abaixo no Quadro 1.1, cuja disfunção é mensurada através do escore clínico SOFA previamente mencionado. É importante enfatizar que o comprometimento de um único órgão na sepse é relativamente raro, de modo que, a falha de um órgão tem relação direta na falha de outro órgão, fenômeno conhecido como *crosstalk* (20).

Quadro 1.1 – Observações clínicas dos seis sistemas avaliados no escore clínico SOFA.

Sistema	Manifestação Clínica
Cardiovascular	Hipotensão. Pele manchada e microcirculação alterada Lactato elevado (para caracterizar quadro de choque séptico). Variáveis ecocardiográficas alteradas.
Respiratório	Hipoxemia. Redução da relação PaO ₂ : FiO ₂ .
Neurológico	Confusão. Desorientação.
Hepático	Aumento nos níveis de bilirrubina e enzimas hepáticas.
Hematológico	Baixa contagem de plaquetas. Coagulação intravascular disseminada (CID).
Renal	Oligúria. Aumento de creatinina sérica e nitrogênio da ureia no sangue.

Das infecções encontradas em coortes de paciente com sepse, a pneumonia é a infecção mais comum (10). Em um trabalho prospectivo que reuniu dados de 14.414

pacientes em 1.265 UTI de 75 países, o EPIC II de Vincent e colaboradores, foi demonstrado que a infecção com origem pulmonar foi responsável por aproximadamente 64% do total de infecções, seguidos de infecções abdominais (20%), da corrente sanguínea (15%) e trato geniturinário (14%), de um total de 7.000 pacientes classificados como infectados (21).

Quanto aos agentes etiológicos, qualquer microrganismo pode desencadear a sepse. Entre os agentes identificados na coorte de Vincent e colaboradores, 62% dos patógenos identificados eram bactérias gram-negativas, 47% bactérias gram-positivas e 19% eram agentes fúngicos (21). No Brasil, um estudo feito com dados de 75 UTIs, mostrou que dentre os agentes identificados, os bacilos Gram-negativos representavam a maior parte dos casos (40,1%), seguidos dos cocos Gram-positivos (32,8%), principalmente *Staphylococcus aureus*, enquanto os fungos representavam 5% dos casos (22).

Algumas comorbidades também são associadas ao maior risco de desenvolvimento da sepse, especialmente nas condições em que o paciente apresenta imunossupressão, como síndrome da imunodeficiência adquirida, doenças autoimunes e pacientes com câncer, devido à própria condição clínica e os efeitos do tratamento; diabetes mellitus, doença pulmonar obstrutiva crônica e obesidade. Recentemente, fatores genéticos e habituais como tabagismo e alcoolismo, também são relatados como fatores de risco (18).

A idade é o fator mais relevante associado a incidência da sepse, sendo também um preditor de mortalidade independente, como avaliado no trabalho de Martin e colaboradores de 2006, onde foi observado que idosos acima de 65 anos são significativamente mais afetados (19). No Brasil também é observado o maior acometimento entre pacientes mais idosos. Das pesquisas epidemiológicas nacionais anteriormente citadas, a média de idade dos pacientes sépticos foi de 65,5 (D.P. = 49,0–79,0), onde as médias de 61,0 (43,0–75,0) e 68,0 (54,5–80,0) correspondem a sobreviventes e não sobreviventes respectivamente, na avaliação randômica de Machado e colaboradores (16). No trabalho de Quintano Neira com os dados do SUS, a média de idade dos pacientes aumentou de 39,1 em 2006 e 2007 para 50,8 em 2014 e 2015 (17).

A heterogeneidade da sepse no que tange a características individuais dos pacientes; agentes etiológicos e sítios de infecção, torna a compreensão fisiopatológica desse quadro clínico um desafio, na prática. A avaliação robusta de dados clínicos é uma

ferramenta fundamental na compreensão das características da sepse, e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, desse modo, os estudos epidemiológicos são importantes para o esclarecimento a relação entre o agente etiológico, sítio de infecção e o desfecho da sepse, como observado no trabalho de Leligdowicz em 2014, onde as infecções intra-abdominais foram associadas a maior mortalidade na coorte avaliada, enquanto infecções do trato urinário foram associadas a menor mortalidade (23).

1.4. Fisiopatologia

1.4.1. A Resposta Imune

A nova definição de sepse e choque séptico engloba aspectos da fisiopatologia como a presença de disfunção orgânica potencialmente fatal ocasionada pelo desequilíbrio da resposta imune à infecção (11). Desse modo, compreender molecularmente os mecanismos de defesa contra infecção é uma etapa fundamental na compreensão da sepse e suas consequências ao organismo dos pacientes acometidos. O sistema imunológico possui diversos mecanismos que atuam continuamente para garantir a homeostase, sendo capaz de agir prontamente em defesa do organismo contra agentes infecciosos e/ou alterações associadas a danos endógenos (24).

Tal processo tem início com estímulos à imunidade inata, através do reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP do inglês: *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) e/ou Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMP do inglês: *Damage-Associated Molecular Patterns*), pelos receptores presentes nas células que compõe o sistema imune. Exemplos clássicos de tais receptores são as proteínas extracelulares da família tipo *Toll* (do inglês: *Toll-like*) e os intracelulares da família dos receptores similares ao Domínio de Oligomerização Ligante de Nucleotídeo (*NOD-like* do inglês: *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors*). Esse reconhecimento dispara uma cascata de sinalização intracelular, com o intuito de promover a transcrição e secreção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas, que de modo geral, atuam promovendo a inflamação, recrutando outras células efetoras do sistema imune como neutrófilos e monócitos circulantes para o local da infecção (25). Nesse contexto dinâmico, o endotélio vascular também se torna ativo, e uma das suas funções é o aumento da permeabilidade e de moléculas que promovem a

adesão celular, possibilitando a entrada de fluidos e de das células efectoras ao sítio de infecção (26).

Em paralelo, as células presentes no local da infecção, são capazes de carrear fragmentos do antígeno processado para tecidos linfoides vizinhos, e apresentar tais fragmentos aos linfócitos, processo que marca a comunicação da resposta imune inata com a resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T, que dará início a mecanismos celulares mais específicos, dependente da característica do agente infeccioso, que desencadeia o perfil da resposta imune necessária para sua eliminação (26).

A resposta imune à infecção também ativa o sistema de coagulação, que consiste na ativação de uma cascata de proteases, levando à rápida ativação da trombina, na deposição de fibrina e na ativação plaquetária. De modo específico, as plaquetas têm como função bem estabelecida, a manutenção da homeostasia, uma vez ativadas e aderidas ao endotélio, a superfície das plaquetas oferece um sítio catalítico para fatores da coagulação, auxiliando também, no importante mecanismo de retenção para o agente infeccioso através da formação das redes de fibrina (27). Além de seu papel na regulação da hemostasia, as plaquetas contribuem com mecanismos associados a resposta imune inata e a inflamação, devido à presença de receptores do tipo *Toll*, a ativação desse receptor nas plaquetas desencadeia as diversas atividades pró-inflamatórias, assim como as atividades pró-trombóticas das plaquetas, correlacionando a imunidade inata e a coagulação, e contribuindo para a oclusão de vasos da microcirculação, no contexto da imunotrombose (28).

Tais mecanismos pró-inflamatórios são estritamente coordenados e têm como objetivo a eliminação do patógeno e o reestabelecimento da homeostase (26). Para equilibrar/regular esses mediadores pró-inflamatórios, reflexos anti-inflamatórios também são ativados, onde resumidamente, a estimulação das fibras nervosas aferentes pelos fatores imunogênicos, induz à sinalização eferente, que ativa o nervo esplênico no plexo celíaco, resultando na liberação de norepinefrina no baço e secreção de acetilcolina por um subconjunto de linfócitos T CD4. A liberação de acetilcolina tem como alvo os receptores colinérgicos, suprimindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (29).

A dinâmica entre os mediadores pró e anti-inflamatórios, de forma coordenada, tem o desfecho resolutivo desejado, no entanto, em alguns casos, a perda do equilíbrio entre os mediadores faz com que atuem de forma desordenada e prejudicial ao próprio organismo. Em geral, os fatores pro-inflamatórios secretados de forma descompensada

ocasionam danos ao tecido hospedeiro levando a disfunção orgânica induzida por sepse, enquanto os fatores anti-inflamatórios podem levar a um quadro de imunossupressão persistente, e aumentar o risco de aquisição de uma infecção secundária (Figura 1.1); em ambos os casos, a magnitude dessas manifestações são dependentes das características específicas de cada indivíduo e da infecção (30).

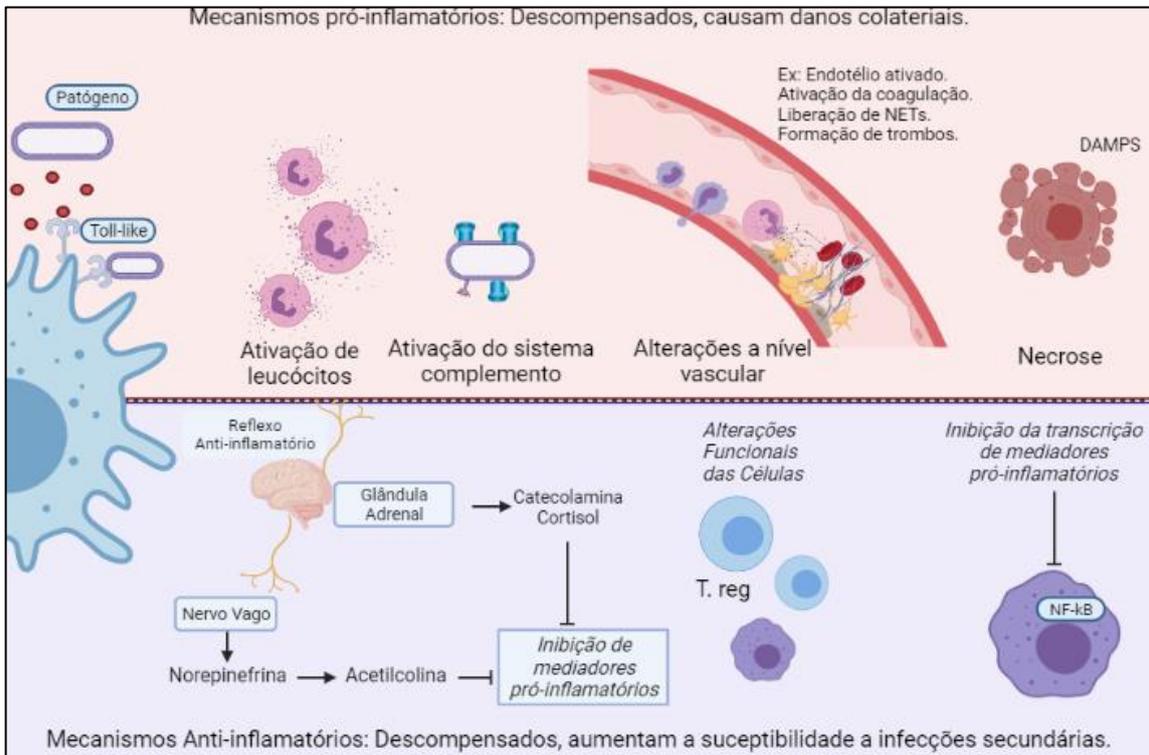


Figura 1.1- Mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios atuantes na resposta imune. O direcionamento equilibrado dos mediadores pró e anti-inflamatórios são influenciados por fatores associados ao hospedeiro e as características da infecção. O início da resposta imune ocorre por reconhecimento de imunógenos por receptores de membrana, do citosol ou em endossomos, que desencadeia a ativação dos mediadores voltados para eliminação do patógeno como ativação e recrutamento de celular efetoras, início da cascata do sistema complemento e do sistema de coagulação. A perda de equilíbrio do eixo pró inflamatório pode levar ao dano do tecido e a morte celular por necrose. Os reflexos anti-inflamatórios descompensados, podem prolongar a dependência dos pacientes aos cuidados da terapia intensiva, apresentando sinais de imunossupressão e aumentando o risco de adquirir infecções secundárias.

1.4.2. Alterações da Microcirculação no Estabelecimento das Disfunções Orgânicas.

Como observado, diferentes sistemas podem ser afetados no estabelecimento da sepse, nesse âmbito, a disfunção endotelial possui um papel central na característica sistêmica e em demais aspectos fisiopatológicos que serão discutidos a seguir (20). Uma

das funções do endotélio vascular é compor a barreira que controla a permeabilidade dos vasos sanguíneos quanto ao fluxo de fluidos e proteínas entre o meio intra e extravascular. As células do endotélio são organizadas por junções célula-célula, que por sua vez são constituídas por diferentes complexos proteicos, como as junções de oclusão (conhecidas pelo termo em inglês: *Tight Junctions*), compostas por ocludinas, claudinas e zônula ocludente, que se conectam ao citoesqueleto da célula adjacente; e as junções aderentes, que possuem proteínas de membrana chamadas caderinas, que se unem a actina através de cateninas (α , β , γ e p120) (31).

Além da função estrutural, especificamente na presença de estímulos, o endotélio torna-se ativo, adquirindo funções capazes de modular mecanismos importantes na resposta imune tais como: secreção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos; aumento na expressão de moléculas de adesão; secreção de fatores pró-coagulantes; aumento da permeabilidade, que permite a migração de fluido e leucócitos para o sítio de infecção específico; e na manutenção da reatividade vascular adequada, dada pela liberação de vasodilatadores ou vasoconstritores que atuam diretamente na musculatura lisa envolta (32). Tais eventos são altamente regulados e fundamentais para manutenção da homeostase, entretanto, em meio ao desequilíbrio dos mediadores da resposta imune durante a sepse, se observa um comprometimento funcional do endotélio, que é descrito como processo chave no estabelecimento das disfunções orgânicas associadas a sepse (33).

Dentre os mecanismos citados na literatura estão: i) O perfil pró-trombótico excessivo, que favorece o início da coagulação intravascular disseminada, ii) alterações do glicocálix endotelial e o aumento significativo na expressão de moléculas de adesão, permitindo a maior interação dos leucócitos e plaquetas com as moléculas de adesão, iii) maior permeabilidade, promovendo o aumento do extravasamento de fluido e formação de edema, contribuindo também para o estado hipovolêmico persistente e iv) a diminuição do tônus vascular, que está diretamente relacionada a níveis elevados de óxido nítrico e peroxinitritos (32,33)

No contexto microvascular, pode ser observada a redução da densidade capilar e consequente alteração da perfusão tecidual adequada, bem como a formação de microtrombos, sendo correlacionada a gravidade das disfunções orgânicas (34). Esse conjunto de eventos hemodinâmicos desequilibrado, tal como ilustrado na Figura 1.2, contribui diretamente com o metabolismo celular anormal de oxigênio, outro fator de grande importância no estabelecimento das disfunções orgânicas. Nesse contexto, o aumento do

lactato sanguíneo, geralmente acima de > 2 mEq/L, reflete o estado de metabolismo celular anormal do oxigênio, sendo um dos critérios na determinação da gravidade dos pacientes com sepse, somado a necessidade de vasopressores para se manter uma PAM mínima, mesmo após a reposição volêmica, caracterizando o choque séptico (11).

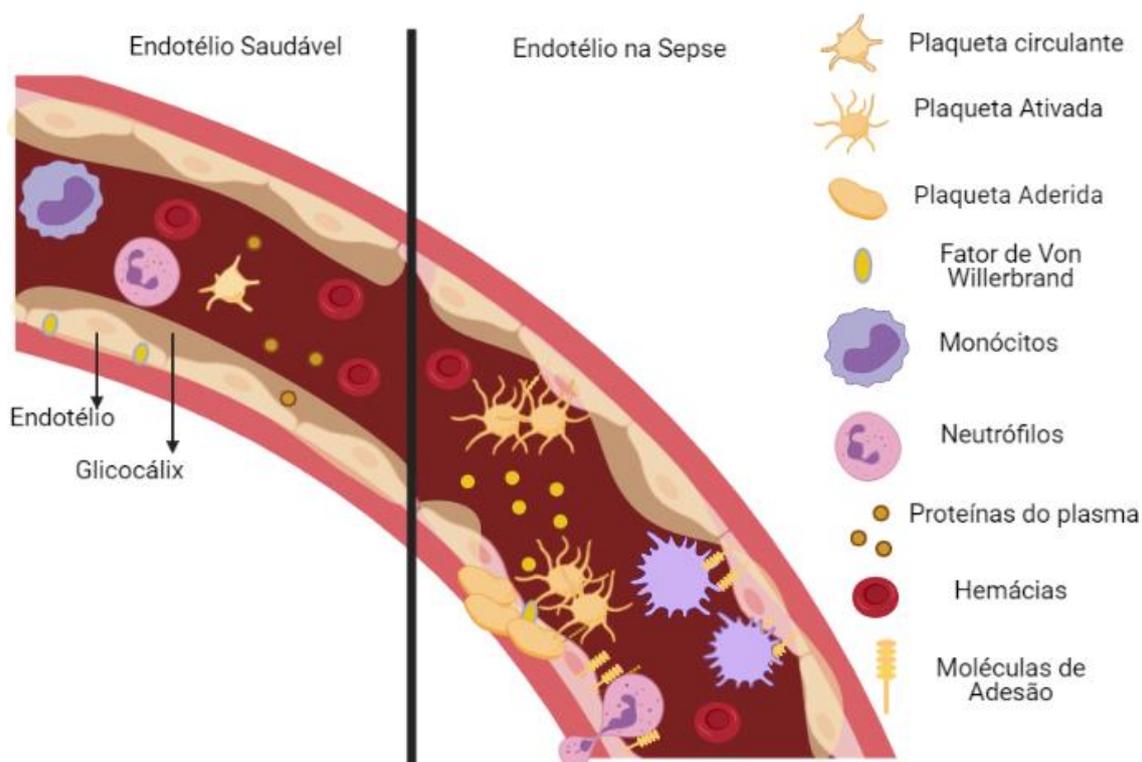


Figura 1.2 - Alterações do endotélio vascular e seus impactos na fisiopatologia da sepse. Diversos mecanismos contribuem para o desenvolvimento de disfunção do endotélio na sepse, sensível às ações dos agentes pró-inflamatórios descompensados, resultando em alterações na integridade do glicocálix, lesões nas próprias células endoteliais, aumento da adesão e infiltração de leucócitos. Adaptado de Christophe Lelubre e Jean-Louis Vincent (20).

Entretanto, nos casos de pacientes com sepse/choque, a fisiopatologia é mais complexa do que o mecanismo de hiperlactatemia causada diretamente por hipóxia (35), visto que, em pacientes reanimados que obtêm um aumento na distribuição global de O_2 e perfusão tecidual adequada, a tensão de O_2 no músculo esquelético permanece elevada, sugerindo uma diminuição no vO_2 local, embora o vO_2 global possa aumentar (36). Esse mecanismo de má utilização do oxigênio local, pode estar associado ao fenômeno de hipóxia citopática, onde a mitocôndria permanece com baixa produção de adenosina trifosfato, mesmo em condições adequadas de oxigenação, indicando o envolvimento de outros mecanismos patogênicos complexos que prejudicam o metabolismo celular (37).

1.4.3. A Comunicação Celular na Resposta Imune

A comunicação entre as células do sistema imune é complexa e dinâmica, uma vez que, as células executam múltiplas atividades, promovendo positivamente algumas respostas e inibindo outras ao mesmo tempo. Tais células se utilizam de componentes como citocinas e quimiocinas, assim como de interações célula-célula, para organizar as reações frente a eventuais ameaças a homeostase. Didaticamente o modo de comunicação celular, são separadas em basicamente três grupos de acordo com suas características: i) a comunicação autócrina, que envolve a ação dos mediadores que se ligam aos receptores da própria célula, como ocorre na secreção da Interleucina 2 (IL-2) para a expansão clonal e de Interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$) para o perfil de resposta Th1 dos linfócitos TCD4, ii) a comunicação parácrina que envolve pelo menos dois tipos de células, uma que secreta um mediador, como exemplo a secreção do Fator 1 Estimulador de Colônias (CSF), e o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), enquanto outro tipo de célula tem o receptor apropriado para a molécula em questão e iii) a sinalização justácrina que envolve duas células nas quais uma possui um ligante alocado na membrana e outra célula possui o respectivo receptor, como exemplo, na interação obrigatória do receptor do linfócito T com o complexo entre peptídeo e complexo principal de histocompatibilidade das células apresentadoras de antígeno. (Figura 1.3) (38).

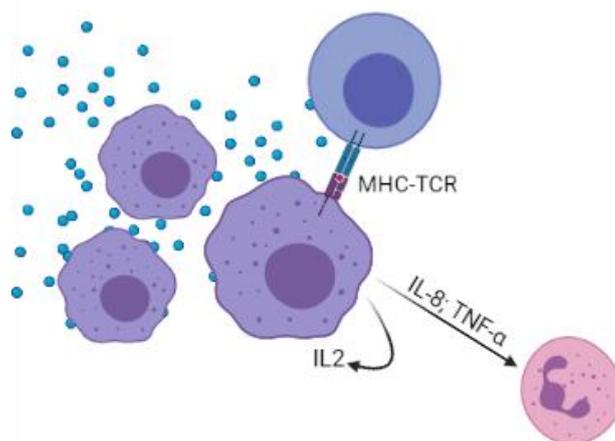


Figura 1.3 - A comunicação celular equilibrada como aspecto crucial no desfecho resolutivo da resposta imune. As células efetoras que orquestram os mecanismos de defesa durante a resposta imunológica necessitam manter a comunicação intercelular em sintonia para que as diferentes ações que visam a eliminação do patógeno, desde o reconhecimento até o *clearance*, tomem a magnitude necessária.

Da mesma forma que as células se comunicam através dos mecanismos de citados anteriormente, outro meio altamente eficiente de comunicação, passou a ser alvo

promissor de investigação, sendo extensivamente explorado na literatura mais recente, especialmente das duas últimas décadas, onde a comunicação entre células, próximas e/ou mais distantes, é mediada pela secreção e captação de estruturas chamadas Vesículas Extracelulares (VEs) entre teoricamente todos os tipos celulares presentes no organismo. As VEs secretadas das células para o meio extracelular, são capazes de carrear biomoléculas que remetem a característica molecular e o estímulo sofrido na célula de origem, modificando funcionalmente a célula receptora (39). Um número crescente de trabalhos na literatura tem evidenciado a participação das VEs em mecanismos fisiopatológicos de diversos contextos clínicos, incluindo câncer, doenças cardiometabólicas, doenças neurológicas e processos infecciosos (40). Os aspectos característicos e o papel das VEs na sepse serão apresentados a seguir.

1.5. Vesículas Extracelulares

1.5.1. Classificação e Características das Vesículas Extracelulares.

As vesículas extracelulares (VEs) são pequenas estruturas esféricas de bicamada fosfolipídica, secretadas a priori por qualquer tipo celular (39) e que naturalmente contêm parte do citoplasma e da membrana plasmática de sua célula parental. Recentemente, a nomenclatura das VEs foi estabelecida em três principais subtipos, de acordo com seu tamanho e biogênese: (i) microvesículas (MVs) se refere a VEs entre 50 e 1.000 nm de diâmetro. São liberadas por brotamento direto da membrana plasmática ao espaço extracelular em resposta a estímulo; (ii) exossomos possuem entre 50 e 150 nm de diâmetro, são primeiramente formados como vesículas intraluminais pelo brotamento interno de endossomos na formação de corpos multivesiculares, até que se fundam com a membrana plasmática liberando os exossomos no espaço extracelular. As diferenças características entre esses dois subtipos de VEs podem ser visualizadas de forma resumida na Figura 1.4, sobre o perfil morfológico/bioquímico e a biogênese; (iii) corpos apoptóticos compõe o terceiro subtipo de VEs liberadas como “*blebs*” de membrana das células em apoptose (41,42). Apesar das diferenças citadas, as semelhanças estruturais tornam a distinção de VEs um grande desafio metodológico (43).

Os subtipos de VEs apresentam uma faixa de sobreposição de tamanho, apesar dos exossomos serem regularmente referidos como as VEs menores. Entretanto, apenas o tamanho não é suficiente para distinguir exossomos de microvesículas (41). Além da

diferença de biogênese, alguns marcadores auxiliam na distinção entre os subtipos, tais como as tetraspaninas CD9, CD63, CD81 marcadores associados ao exossomo, e por se tratar do brotamento direto da membrana, os mesmos marcadores celulares comuns são associados as microvesículas de acordo com sua origem (41). As VEs também possuem características semelhantes a outras estruturas circulantes, como em tamanho sobreposto com algumas lipoproteínas e agregados proteicos. O co-isolamento dessas estruturas é um obstáculo experimental comum, uma vez que, VEs e apolipoproteínas possuem características biofísicas comuns, como densidade e tamanho, que são exploradas em alguns modos de isolamento de VEs do plasma (44).

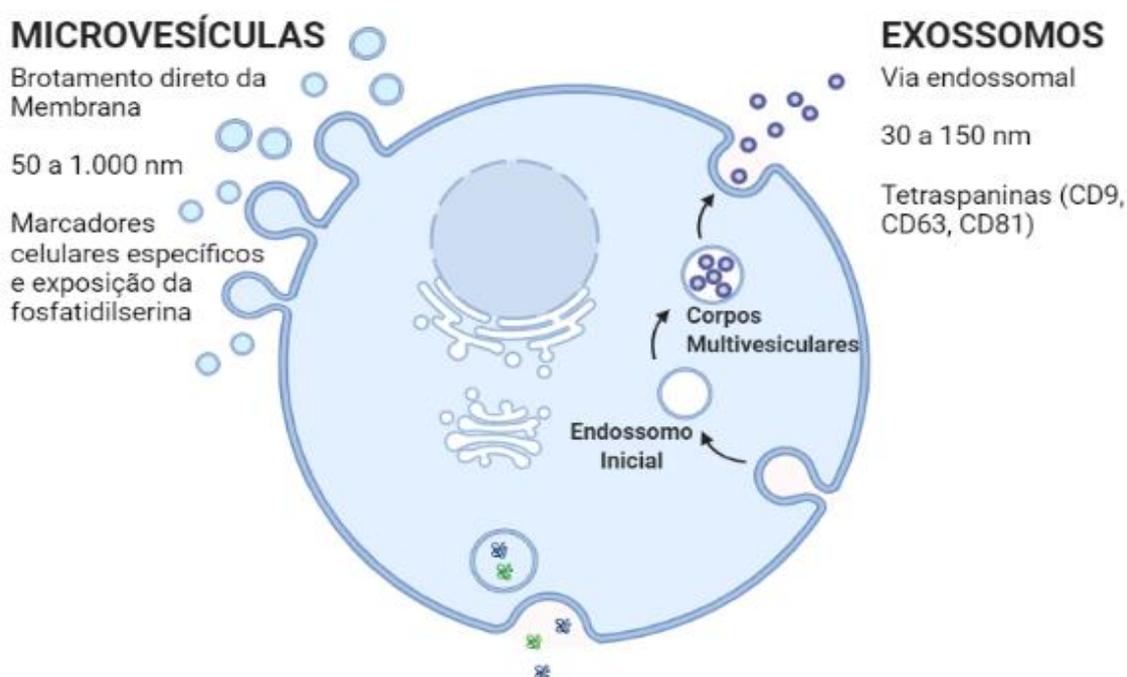


Figura 1.4 - Características gerais e biogênese das vesículas extracelulares. As distinções mais regulares associadas aos subtipos de VEs se baseiam na origem, no tamanho, e em marcadores comuns, embora ocorram eventuais sobreposições, como os marcadores de via endossômica na superfície dos exossomos, devido a sua origem, e ligação da anexina V a fosfatidilserina exposta na superfície das MVs somado aos marcadores de membrana da sua célula de origem.

Quanto a característica do conteúdo molecular das VEs, composto por proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, refletem diretamente o fenótipo molecular da célula de origem (39). O conteúdo proteico especificamente, é caracterizado por um conjunto regularmente encontrado nos trabalhos que investigam o proteoma de VEs, especialmente proteínas constituintes e de manutenção do citoesqueleto; proteínas citosólicas envolvidas na transdução de sinal; complexo de histocompatibilidade; proteínas *heat shock*, de canais e

receptores de membrana, bem como em proteínas envolvidas no tráfego de vesículas, como representado na Figura 1.5 (45). Recentemente foram criados repositórios, onde grupos de investigadores podem analisar e depositar novos achados em endereços de web gratuitos como: Vesiclepedia disponível no programa FunRich (<http://funrich.org>); Exocarta, disponível em: <http://exocarta.org/index.html>

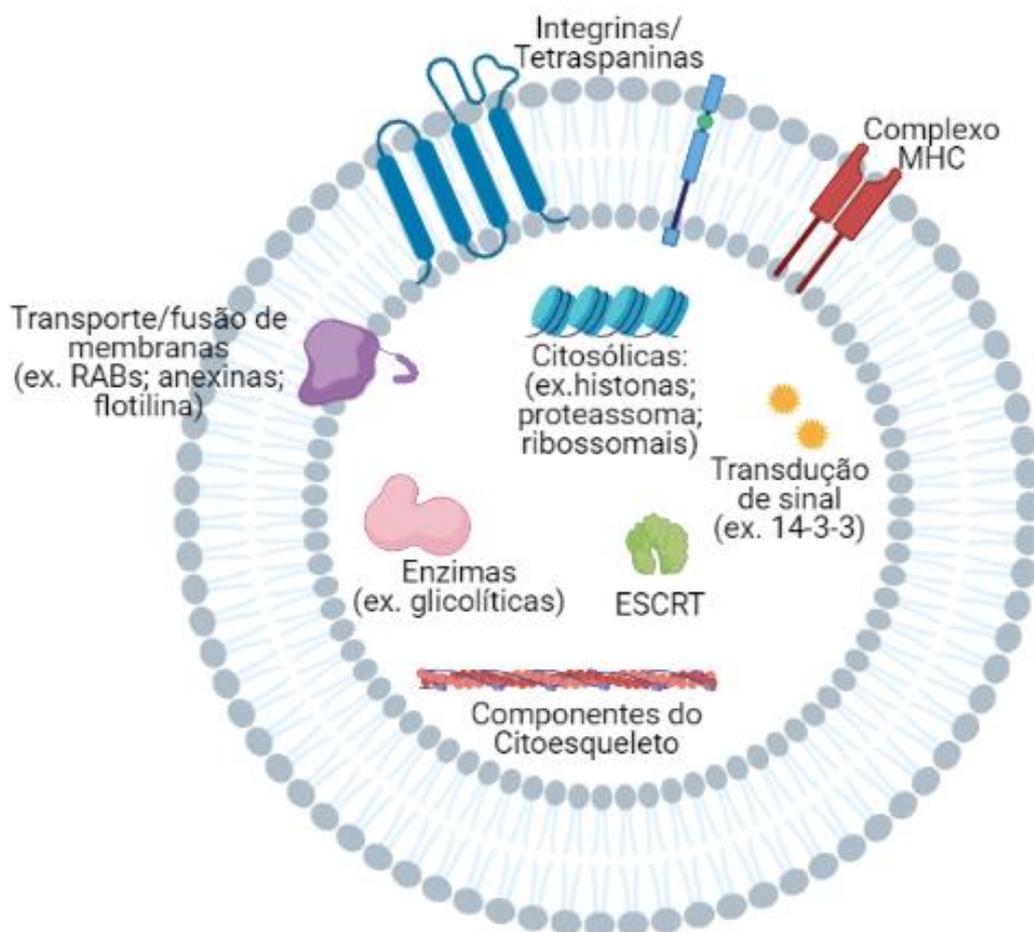


Figura 1.5 - Biomoléculas comuns encontradas nas Vesículas Extracelulares. O conteúdo de biomoléculas das VEs depende diretamente da sua célula de origem. Atualmente milhares de entradas proteicas compõe o banco de dados atual do consórcio Vesiclepedia, que inclui dentre as proteínas mais comuns, enzimas glicolíticas; Proteínas de transdução de sinal, proteínas do citoesqueleto; complexos de MHC, histonas, componentes de proteassoma entre outras proteínas associadas a formação das VEs na via endossomal ou por brotamento direto da membrana. RABs: Ras-related proteins RAB. ESCRT: endosomal sorting complex required for transport. MHC: major histocompatibility complex. Figura adaptada de: Colombo e colaboradores (39)

Tal capacidade celular de secretar e captar VEs, tanto entre células próximas como células distantes, compartilhando biomoléculas sem a necessidade de contato direto, permite que as células receptoras adquiram novas moléculas, que podem alterar

funcionalmente os mecanismos de sinalização, ampliando rapidamente os processos desencadeados pela célula de origem (46). Dessa possibilidade de interceptar “pacotes de mensagens celulares” com informação biológica específica, emergiu na literatura um interesse particular nesse mecanismo de comunicação mediado por VEs, tornando-as excelentes fontes de informação que auxiliam na compreensão da fisiopatologia de diferentes contextos clínicos complexos, como câncer, doenças cardiometabólicas, neurológicas e processos infecciosos, bem como fontes promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (40).

1.5.2. Histórico

O foco emergente de pesquisa em VEs é atualmente centrado na caracterização fenotípica dessas estruturas, nos mecanismos de sua formação a partir de células parentais e na determinação de seus efeitos nas células receptoras, com ênfase em condições patológicas (47). A descoberta de seu papel funcional tem um histórico relativamente recente, tendo como marco inicial o trabalho de Peter Wolf em 1967, cujo objetivo foi analisar e esclarecer os eventos de coagulação do sangue. O autor relatou de forma inédita *“evidências para a ocorrência em plasma normal, soro e frações derivadas de material coagulante na forma de partículas minúsculas, sedimentáveis por alta velocidade de centrifugação e proveniente de plaquetas”* que chamou de *“poeira de plaqueta”* referindo-se ao que hoje conhecemos por microvesículas plaquetárias (48).

Sequencialmente, outros autores descreveram VEs em diferentes amostras biológicas, como: tumores (49); culturas celulares de linhagens normais e neoplásicas (50); plasma (50), sêmen (51), e urina (52); enquanto a função de comunicadores intercelulares, foi consolidada progressivamente, com base em observações da presença de componentes em mecanismos importantes na manutenção da homeostasia, como a identificação do fator tecidual em microvesículas obtidas de cultura de glioblastoma, ainda em 1984 (53) assim como outros renomados trabalhos que indicavam principalmente o perfil pró-trombótico dessas VEs em contextos fisiopatológicos (39).

Ainda na década de 80, paralelamente, foram publicados os primeiros trabalhos acerca do novo mecanismo de secreção de partículas com origem da via endossomal, que conhecemos atualmente por exossomos (54). Posteriormente, o papel funcional desse subtipo de VEs, no contexto do sistema imune, foi proposto com os trabalhos do grupo da investigadora Raposo, na década de 90, demonstrando que os exossomos oriundos de

células B, transformadas pelo vírus Epstein-Barr, possuíam o complexo de histocompatibilidade MHC II, e que esses eram capazes de ativar os linfócitos T CD4, abrindo diversas possibilidades de investigação acerca do papel das VEs na comunicação celular durante a resposta imune (55).

Nos anos 2000 com a descoberta da presença de ácido ribonucleico (RNA do inglês: *Ribonucleic Acid*) interiorizado nos exossomos, incluindo a presença de tipos de RNA não codificantes (56), o interesse nessas estruturas como fontes de comunicação intercelular foi fortemente consolidado, e em pouco tempo, esforços internacionais e multidisciplinares tem contribuído no processo de caracterização e padronização das metodologias aplicadas ao estudo das VEs. Um dos grandes avanços foi a criação da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares em 2011, que além de abrir um amplo espaço de diálogo entre os investigadores, colaborou significativamente na padronização da nomenclatura e de metodologias básicas aplicadas a estudos com VEs (43).

O interesse no papel das VEs na comunicação intercelular do sistema imune abrange uma nova perspectiva em elucidar processos fisiopatológicos complexos, iniciado na descoberta do papel dos exossomos contendo imunógenos, capazes de ativar células T por meio direto da interação com receptor do linfócito T, ou por internalização das VEs pelas células apresentadoras de antígeno, e exposição do imunógeno na membrana (57), criando um novo campo de busca com possibilidades para elucidar mecanismos nos quais as VEs possam influenciar o curso da resposta imune.

As VEs participam da ampla rede de mecanismos que atuam na resposta imune, auxiliando, por exemplo, na ativação da coagulação (46), um mecanismo que vem sendo frequentemente estudado devido seu impacto clínico, em decorrência de algumas condições graves como aterosclerose, embolia e nas condições mais graves como a sepsis (58). Vale ressaltar que o papel fisiológico das VEs assim como de suas células de origem, compreende garantir a homeostase, nesse sentido as VEs também possuem um importante papel em mecanismos reguladores, cuja dinâmica e relevância no decorrer de processo infeccioso permanece alvo de investigação (46).

Tabela 1.4 – Breve histórico das VEs no campo da pesquisa. Desde o primeiro relato, sem conclusões funcionais concretas, até o atual cenário de interesse nas VEs como mediadores da comunicação intercelular em contextos fisiopatológicos.

Décadas em que ocorreram descobertas importantes acerca das VEs.	Principais achados
Década de 60	Descoberta de “ <i>partículas minúsculas</i> ” oriundas de plaquetas.
Década de 80	Observação da atividade pró-trombótica das microvesículas; e descoberta do mecanismo de biogênese dos exossomos.
Década de 90	Descobertas sobre o papel de VEs na resposta imune, especificamente na ativação de linfócitos T CD4.
Anos 2.000 em diante	Descoberta de RNA interiorizado nos exossomos; Interesse crescente em VEs como mediadores da comunicação celular em processos fisiopatológicos.

1.5.3. O Papel das Vesículas Extracelulares na Sepse

Nas últimas duas décadas, foram publicados estudos originais que exploram o papel das VEs em condições graves como a sepse. No entanto, a quantidade de trabalhos publicados não reflete diretamente o progresso teórico e clínico esperados, visto que os métodos para isolamento, análise e interpretação de dados que abordam o papel funcional das VEs em doenças complexas, permanecem em desenvolvimento, o que resulta na variabilidade de dados, bem como na dificuldade de comparar os estudos existentes relacionados à sepse (59).

Um fator característico que contribui para essa variabilidade experimental, é a heterogeneidade entre os pacientes em condições graves, quanto aos aspectos demográficos, aos agentes etiológicos causadores das infecções, as comorbidades pré-existentes, como também os fatores associados a infraestrutura das unidades de saúde. Buscar características clínicas homogêneas para estudos com pacientes sépticos, como

sítio de infecção, por exemplo, pode colaborar com achados relevantes para tais subgrupos de pacientes. No entanto, a preservação da heterogeneidade contribui para que os dados sejam mais robustos e aplicáveis a uma população-alvo ampla (59). Apesar dos obstáculos em investigações presentes em ambas as áreas de investigação (sepse e VEs), alguns trabalhos originais que investigaram do papel das VEs em pacientes com sepse, recentemente sumarizados por Raeven e colaboradores, demonstraram pontos positivos que justificam o interesse clínico nas VEs no contexto da sepse (59).

A sepse desencadeia uma extensa ativação das células efetoras que atuam na resposta imune. As células ativadas promovem a secreção de VEs, sendo a maioria das VEs circulantes oriundas de plaquetas (60,61). Enquanto alguns estudos demonstram que microvesículas estão aumentadas em amostras de pacientes com sepse quando comparados a doadores saudáveis (62,63), outros apresentam resultados controversos, onde estas diferenças não são significativas (64) ou até inversas (65), possivelmente devido à heterogeneidade dos desenhos experimentais. No entanto, os aspectos funcionais das VEs circulantes sobre as células receptoras permanecem sendo elucidados progressivamente.

O papel funcional da VEs na sepse é associado tanto a mecanismos protetores quanto prejudiciais (Figura 1.6). Alguns estudos exploratórios demonstram que determinados subtipos de VEs podem contribuir para resolução da infecção, aumentando a depuração bacteriana (66), modulando atividade anti-inflamatória de leucócitos (67) e potencializando a capacidade fagocítica, demonstrado em células da linhagem monocítica (68). Por outro lado, diversos relatos indicam efeitos prejudiciais, como demonstrado em modelo de endotoxemia suína, onde o aumento de microvesículas plaquetárias foi acentuado nos casos de óbito, e não nos animais sobreviventes (69). No trabalho de Mortaza e colaboradores, foi observado que ratos com sepse induzida por ligadura e punção cecal (CLP do inglês: Cecal Ligation Puncture), apresentaram um fenótipo específico de VEs, majoritariamente oriundas de leucócitos, e submetendo ratos saudáveis a inoculação com VEs dos ratos com sepse induzida, foram observados padrões hemodinâmicos e inflamatórios, associados a estresses oxidativo e nitrosativo, característicos da sepse (70). Em outro interessante estudo, o bloqueio da liberação de VEs por macrófagos infectados em camundongos sépticos teve efeitos cardioprotetores e sobrevida prolongada (71). A dinâmica das VEs, quanto a origem celular e conteúdo de biomoléculas nesses mecanismos protetores e prejudiciais na sepse, permanecem pouco esclarecidos.

As VEs tem sido associadas a processos comuns no estabelecimento da sepse, como na coagulação intravascular disseminada (CID) devido ao ser perfil pró-trombótico (72), e em mecanismos que promovem a disfunção endotelial, como na ativação direta e apoptose das células endoteliais levando ao comprometimento da barreira endotelial (73). Durante a resposta imune à infecção, a coagulação é um mecanismo importante tanto na manutenção da homeostasia como na compartimentalização do agente infeccioso, impedindo sua disseminação (74). No entanto, as consequências de uma forte ativação da coagulação é um fator que pode contribuir com a perda da integridade do endotélio, e promover o desenvolvimento da trombose microvascular, colaborando com o estabelecimento de disfunções orgânicas (75). Na sepse, a relevância do fator tecidual, componente fundamental da cascata de coagulação, assim como a liberação descompensada de citocinas inflamatórias é notado regularmente em ensaios *in vitro* e *in vivo* (76). Em concordância com potencial pró-trombótico observado em diversos estudos, o papel das VEs no desenvolvimento CID foi observado em alguns pacientes com sepse, o que também foi relacionado a severidade (77).

Como visto anteriormente, a disfunção endotelial tem um papel central no estabelecimento das disfunções orgânicas. Assim como as células de origem, as VEs atuam de modo ambíguo sobre o endotélio, com funções que podem preservar sua integridade, ou promover ações potencialmente nocivas (78). As VEs oriundas de plaquetas são frequentemente reportadas em associação ao aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais, além de aumentar a produção de citocinas pró inflamatórias como interleucinas (IL)-1; IL-6 e IL-8 (79). As VEs também foram associadas a mecanismos de regulação entre apoptose/sobrevida das células endoteliais (80). Em um trabalho conduzido por Janiszewski e colaboradores, foi demonstrado que exossomos, principalmente os de origem plaquetária, isolados de indivíduos sépticos, são capazes de induzir a produção de superóxido e promover a apoptose em células vasculares, por mecanismos inflamatórios e redox (81). Além do efeito de interação direta, VEs plaquetárias modulam a interação de leucócitos ou VEs de leucócitos com o endotélio, especialmente nos mecanismos de adesão celular; indução de apoptose e aumento do perfil pró-trombótico (78).

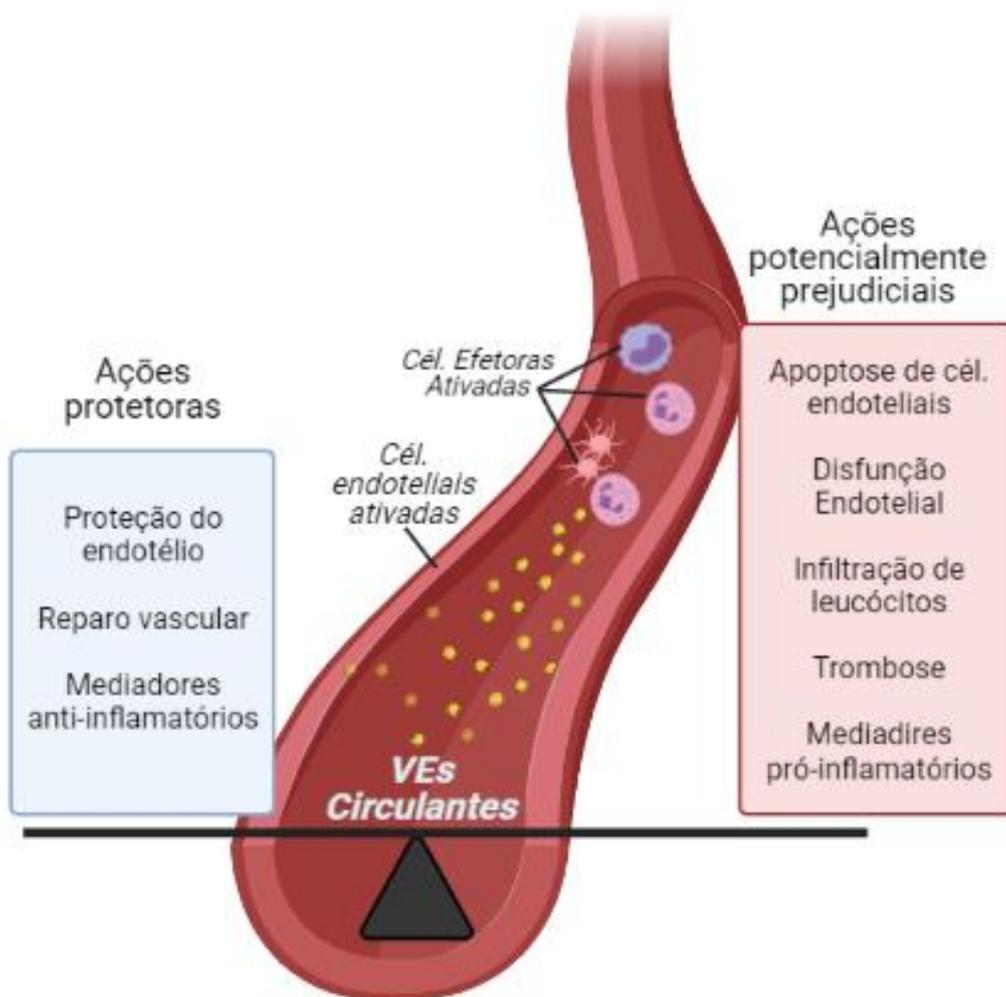


Figura 1.6 - Ações protetoras e prejudiciais das vesículas extracelulares circulantes. As possíveis funções das VEs dependem da origem celular, o estímulo sofrido na célula de origem e as características da célula receptora.

1.5.4. Abordagens Metodológicas de Larga Escala no Estudo das Vesículas Extracelulares

Para classificação do conteúdo biomolecular das VEs, bem como enriquecer a compreensão acerca das suas diversas funções fisiológicas e patológicas, milhares de proteínas e componentes de RNA de VEs, derivados de diversos tipos de células e fluidos corporais, tem sido catalogados com auxílio de abordagens metodológicas de larga escala, também conhecidas como ciências ômicas (45).

As ciências ômicas emergiram do grande avanço tecnológico, na análise de um conjunto de biomoléculas com alto rendimento, que geralmente resulta em uma quantidade massiva de dados, analisados por ferramentas de bioinformática. As áreas de

pesquisa que compõe as ciências ômicas podem ser classificadas como Genômica, Proteômica, Transcriptômica, Metabolômica e Lipidômica, que compreendem a análise global de genes, proteínas, RNA, metabólitos e lipídeos respectivamente, para análise abrangente de um sistema biológico de interesse (82).

Ao realizar uma busca simples na ferramenta PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando os termos [Proteomics OR Proteome] AND [Extracellular Vesicles] e [Transcriptomics OR Transcriptome] AND [Extracellular Vesicles], podemos constatar o crescente interesse no conteúdo proteico e de transcritos destas estruturas (Figura 1.7).

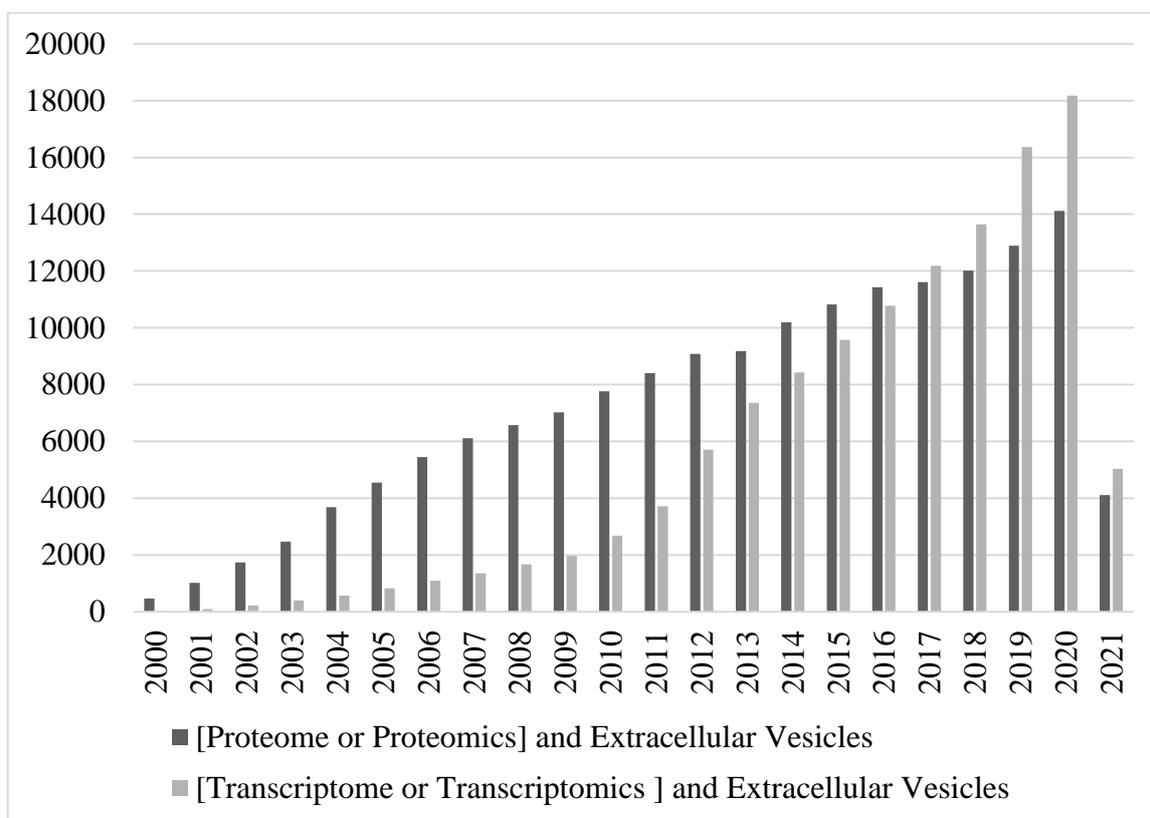


Figura 1.7 - Publicações que abordaram a proteômica ou transcriptômica no estudo das VEs. As publicações que aplicam ou abordam a aplicação da proteômica e/ou transcriptômica no estudo das VEs em diversos contexto biológicos passou de algumas centenas nos anos 2.000 para cerca de 10.000 publicações a partir de 2015. Busca realizada no Pubmed em março de 2021.

A transcriptômica é uma ferramenta de grande interesse na avaliação de perfis moleculares associados a sepse e seus diferentes desfechos, sua aplicação ao estudo do conteúdo de RNAs de VEs é crescente, tal abordagem aplicada ao sangue periférico total, aponta distinções na expressão de genes, capazes de distinguir pacientes com sepse e

SIRS, assim como sobrevida e óbito entre os pacientes sépticos, onde a ativação de genes relacionados à resposta imune foi silenciada em não sobreviventes (83). Sua aplicação voltada para análise de VEs foi abordada em um interessante trabalho, conduzido por Real e colaboradores, onde exossomos foram isolados de 24 pacientes com choque séptico para comparação com exossomos de doadores saudáveis. A expressão de micro RNAs relacionados ao metabolismo redox foi significativamente maior nos pacientes, com destaque para mieloperoxidase que permaneceu regulada positivamente após 7 dias de internação (84).

De modo particular, a análise do proteoma (conjunto de proteínas), fornece informações importantes na observação de possíveis variações de perfis moleculares, visto que alguns transcritos, passam por mecanismos de regulação pós-transcricional, e não necessariamente correspondem diretamente a abundância de determinada proteína (85). Por sua vez, as proteínas são as biomoléculas efetoras e refletem diretamente os processos biológicos de interesse, sendo uma ferramenta valiosa na busca de biomarcadores e na compreensão de mecanismos fisiopatológicos complexos e pouco esclarecidos, o que pode contemplar novos achados que não seriam explorados em abordagens baseadas em hipóteses pré-estabelecidas (86).

O espectrômetro de massas é o equipamento central para análise proteômica, que permite a identificação dos íons peptídeos oriundos do proteoma de interesse, através da classificação dos analitos em campos elétricos ou magnéticos, de acordo com os valores da razão massa sobre carga. Atualmente, essa ferramenta é precedida em tandem por uma nanocromatografia líquida de alta performance (nLC - MS), que permite análise e identificação de uma quantidade expressiva de peptídeos com acurácia e precisão, com auxílio de ferramentas de bioinformática cada vez mais eficientes (87). Esses avanços metodológicos contribuíram significativamente com a identificação abrangente do proteoma de VEs, e atualmente esses achados podem ser consultados no banco de dados específicos de biomoléculas identificadas em VEs, o Vesiclepedia, que conta com aproximadamente 32 mil entradas proteicas para VEs em humanos, grande parte proveniente de trabalhos que utilizaram as ferramentas proteômicas (88).

A inferência das identificações proteicas através da identificação de seus íons peptídeos, compõe uma das técnicas empregadas na análise proteômica, denominada *Shotgun* ou *bottom up*, sendo essa a abordagem mais usual para análises em larga escala ou de alto rendimento de amostras complexas (89). Essa a ferramenta exploratória foi crucial, por exemplo, no que se conhece atualmente acerca dos novos sinais para a

secreção de VEs na resposta imune. Com auxílio da proteômica *shotgun*, foi demonstrado em alguns trabalhos, que ativadores canônicos do inflamassoma NLRP3, bem como ativação não canônica dependente de caspase-4, induzem a secreção de VEs e de proteínas importantes associadas a VEs, incluindo a forma precursora da IL-1 β (90–93). Recentemente a análise proteômica *shotgun* foi utilizada para investigar o proteoma de exossomos isolados de pacientes com sepse, comparado a exossomos de voluntários saudáveis. Nesse trabalho, a representação biológica apontou essencialmente diferenças quanto a resposta de fase aguda e inflamação, mais acentuadas no proteoma dos exossomos de pacientes (94).

Por fim, a aplicação da proteômica voltada para o estudo das VEs, oferece uma vantagem particular no que tange a utilização da espectrometria de massas em amostras clínicas de plasma, uma vez que, o grande intervalo dinâmico entre proteínas plasmáticas, prejudica a análise das proteínas menos abundantes, fenômeno conhecido como supressão de sinal, pois tal identificação é usualmente feita com base no sinal dos peptídeos mais abundantes em cada varredura de análise no espectrômetro de massas (95,96). Mesmo com alternativas quanto ao tratamento prévio do plasma para retirada de proteínas mais abundantes (97), e de ferramentas no próprio equipamento que buscam minimizar esse efeito, a análise proteômica do plasma permanece uma abordagem que requer cautela. Nesse sentido, voltar a atenção para um subproteoma de estruturas diretamente envolvidas na sinalização celular, pode conferir também uma vantagem metodológica, desde que seja estabelecido um protocolo adequado de preparo pré-espectrometria.

2. Justificativa

O uso de metodologias de larga escala, ditas ômicas, vem contribuindo significativamente na identificação dos mecanismos moleculares envolvidos na biogênese, composição e caracterização das VEs em contextos fisiológicos e patológicos (98). Adicionalmente, a proteômica – análise de proteínas em larga escala – é capaz de caracterizar o fenótipo molecular de diferentes amostras, sendo assim uma ferramenta valiosa em estudos dirigidos por descoberta, cuja complexidade molecular não é completamente esclarecida (99).

Desde a descoberta das VEs e seu potencial como comunicadores intercelulares, seu papel como mediadores em várias condições clínicas, tem sido intensamente investigado. Entretanto, a importância e o potencial funcional em mecanismos associados ao estabelecimento da sepse, ganharam atenção apenas recentemente. Ambos os componentes dessa abordagem investigativa, sepse e VEs, são complexos e carecem de padronizações metodológicas. Não há um consenso na literatura sobre como as VEs plasmáticas devem ser isoladas e caracterizadas. Dessa forma, são necessários estudos de padronização do isolamento de VEs em amostras clínicas como o plasma, que permitam a identificação de possíveis perfis moleculares, que contribuam para compreensão ampla das funções que as VEs exercem sobre os mecanismos associados ao estabelecimento da sepse.

3. Objetivos

3.1. Geral

Caracterizar o proteoma de VEs isoladas do plasma de pacientes com sepse e choque séptico, com intuito de identificar perfis proteicos relacionados ao desenvolvimento da sepse e que possam contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na desregulação da resposta imune.

3.2. Específicos

- ✓ Padronizar a metodologia de obtenção de VEs do plasma;
- ✓ Caracterizar as VEs plasmáticas e seu conteúdo proteico;
- ✓ Identificar perfis moleculares que possam diferenciar os grupos de análise: controle, sepse e choque séptico;
- ✓ Inferir sobre vias bioquímicas que sejam importantes no contexto da sepse através de análises de enriquecimento *in silico*.

4. Metodologia

4.1. Coorte e critérios de inclusão e exclusão das amostras

Cerca de 150 amostras de pacientes internados nos hospitais da Rede D'Or, entre agosto de 2015 e setembro de 2017 fazem parte do estudo “Avaliação da disfunção cerebral em pacientes com sepse grave: estudo observacional”, sob coordenação do Dr. Fernando Augusto Bozza. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa local e registrado na plataforma Brasil sob o número 19752613.9.1001.5249 (Anexo I).

Os critérios para inclusão das amostras foram: pacientes com idade superior a 18 anos, com diagnóstico de sepse ou choque séptico por infecção adquirida na comunidade e que tenham assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) referente ao estudo. Foram excluídas as amostras de pacientes com alta probabilidade de óbito dentro de 48h ou com expectativa de permanência na UTI <48h; pacientes hospitalizados há mais de 48h antes da inclusão no estudo; ou transferidos de outra unidade com mais de 48h da internação. Os pacientes foram reclassificados de acordo com a nova definição de Sepse e Choque Séptico, feita em 2016 (11), o que não alterou a classificação de gravidade. Dessa coorte, foram selecionadas 18 amostras, com base essencialmente no pareamento por gênero e idades mais próximas, de modo que os grupos de análise foram compostos por: 9 amostras de pacientes diagnosticados com sepse e 9 amostras de pacientes com choque séptico. Amostras que apresentaram hemólise ou volume de plasma inferior a 400 μ L não foram consideradas.

Para compor o grupo controle, nove amostras de plasma de doadores saudáveis foram coletadas por acesso venoso em anticoagulante citrato. Todos os voluntários assinaram o TCLE referente ao projeto (Anexo II) e preencheram uma ficha com informações adicionais que otimizam trabalhos com vesículas extracelulares, recomendada pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (43) (Anexo III). O plasma das amostras controles foi obtido após centrifugação do sangue coletado a 1.500 x g por 20 minutos, seguido de duas centrifugações de 3.000 x g por 15 minutos. Ao final, as amostras foram armazenadas a -80 °C junto às amostras de plasma dos pacientes.

4.2. Padronização do Isolamento de Vesículas Extracelulares (VEs):

Duas abordagens foram a base da etapa de padronização do isolamento de VEs do plasma: centrifugação seriada (CS) e cromatografia de exclusão molecular (SEC). A

adição de uma etapa anterior de ultracentrifugação com gradiente de densidade bifásico (UG) também foi testada. Assim, foram realizados 4 ensaios, conforme a Figura 4.1.

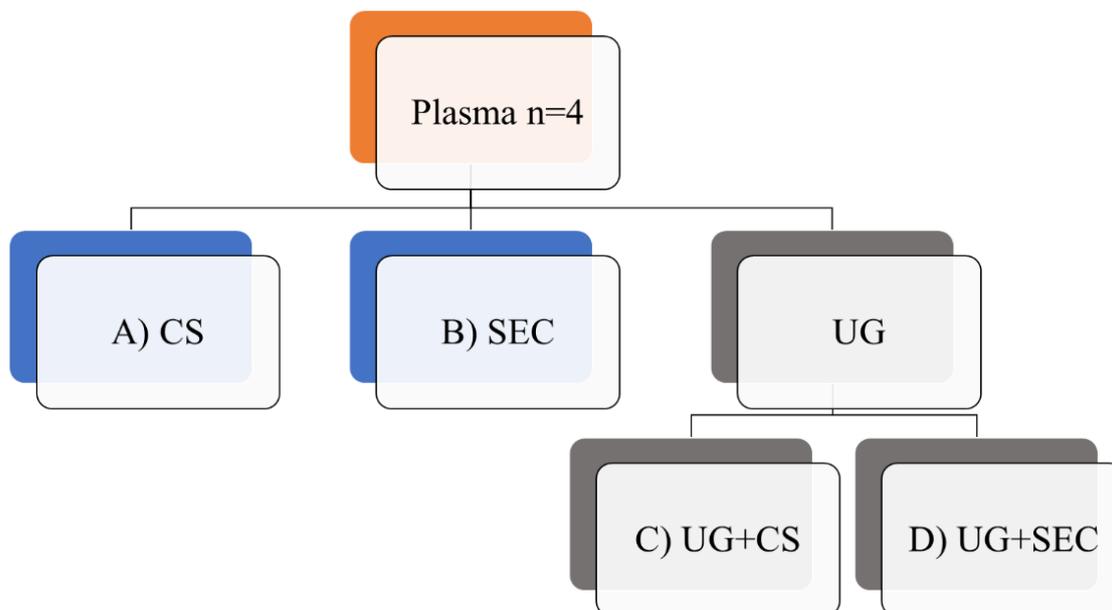


Figura 4.1 – Fluxograma dos experimentos realizados na etapa de padronização do isolamento de VEs do plasma. Cada ensaio (de A à D) foi realizado com 1,0 mL de plasma, 4 vezes ($n = 4$), com amostra de 4 doadores saudáveis.

4.2.1. Preparo das amostras de plasma

O sangue periférico foi coletado de 4 voluntários saudáveis ($n = 4$), por punção venosa em anticoagulante citrato, sem hemólise visível e evitando-se a ativação plaquetária. As amostras foram centrifugadas a $1.500 \times g$ por 20 min., em temperatura ambiente, e o plasma sobrenadante foi centrifugado em três ciclos de $3.000 \times g$ por 15 min., para obtenção de plasma pobre em plaquetas. O inibidor de protease MiniComplete EDTA *free* Roche® foi aplicado ao plasma proporcionalmente em 1:50 (v / v). Cada uma das 4 amostras de plasma foi separada em duas alíquotas, a primeira para tratamento por ultracentrifugação em gradiente de densidade bifásico e a segunda para isolamento direto das VEs do plasma total. Todas as amostras foram armazenadas imediatamente a -20°C .

4.2.2. Ultracentrifugação com gradiente de densidade bifásico (UG)

Para ultracentrifugação com gradiente de densidade bifásico foram utilizadas 1,0 g de KBr para cada 2,0 mL de plasma, ajustado com NaCl 0,9 % até 8,0 mL em tubos Ultra-Clear™. Os tubos foram equilibrados com auxílio da solução salina e cuidadosamente selados para ultracentrifugação, com a centrífuga Optima Max – XP Swinging Bucket, a 150.000 x g por 2 h 40 min a 4 °C (aceleração 5 e parada 8). Ao final da ultracentrifugação, 750 µL foram retirados duas vezes do fundo de cada tubo para obtenção do plasma livre de LDL. Protocolo de Redgrave e colaboradores (100), adaptado pelo Dr. Eugênio Hottz. O plasma resultante foi armazenado a -20°C até o dia da aplicação das técnicas de isolamento por centrifugação seriada e SEC.

4.2.3. Centrifugações seriadas (CS)

Para centrifugação seriada, as alíquotas de 1,0 mL de plasma total e do plasma livre de lipoproteínas de baixa densidade (LDL do inglês: Low Density Lipoprotein) foram centrifugadas em 3 ciclos. As centrifugações foram feitas a 16.000 x g por 2 h 30 min, com temperatura a 4 °C. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi retirado, restando aproximadamente 100 µL do volume total no tubo, e posteriormente foi adicionado 0,9 mL de Tampão Fosfato Salino (PBS) filtrado a 0,22 µm. O mesmo procedimento é repetido na segunda e terceira centrifugação, e ao final da terceira etapa, os 100 µL restantes foram armazenados a -20 °C. Protocolo adaptado de Kowala e colaboradores (101,102).

4.2.4. Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

Colunas de 10 mL PD10 (GE Healthcare) foram empacotadas resina Sepharose CL-2B (Sigma Aldrich) em água com 20% de etanol e armazenadas a -4°C até o dia de uso. Para realização da cromatografia, cada coluna foi equilibrada com 50 mL (5 volumes) de PBS filtrado com membranas de 0,22 µm. Foi aplicado 1,0 mL de plasma, fracionado em 35 microtubos com aproximadamente 500 µL cada. A eluição das proteínas foi acompanhada pela leitura de 2 µL de cada fração em absorvância a 280nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). O resultado foi exportado e o cromatograma

montado no programa PRISMA 5.0. Protocolo adaptado de Böing e colaboradores (103,104).

4.2.5. Detecção das VEs entre as frações da SEC

As 16 primeiras frações da SEC, realizada com 1 mL de plasma de amostra controle, foram submetidas a citometria de fluxo de acordo com as seguintes etapas: Incubação com anticorpos anti-AnnexinaV, durante 30 minutos, a 37°C, para detecção da fosfatidilserina exposta nas VEs. Os anticorpos isotípicos correspondentes foram utilizados para controlar a ligação não específica. As VEs foram distinguidas por ligação específica de anti-AnnexinaV. Foram considerados os eventos positivos para AnnexinaV e menores que 1 µm, adquiridos através do citômetro de fluxo FACScalibur (BD Bioscience, CA).

Para inferir a quantidade de VEs ao longo das frações da SEC, foi aplicada a técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA do inglês: *Nanoparticles Tracking Analysis*). Neste sistema, após incidência de um feixe de laser sobre a amostra, as partículas em suspensão no caminho do feixe, espalham a luz de tal maneira que estas são visualizadas através de um microscópio de luz padrão, equipado com câmera sCMOS, capaz de capturar 30 quadros por segundo (fps). A câmera captura, em arquivos de vídeos, as partículas que se movem sob movimento browniano. Em sequência, o programa processa os vídeos capturados, rastreando as partículas individualmente. Aplicando-se a equação de Stokes-Einstein, o programa calcula o diâmetro das partículas, permitindo assim a determinação de concentração e tamanho (105).

Nessa abordagem, cada fração eluída da SEC feita com 1 mL de plasma controle, foram diluídas 50 x em PBS, e aproximadamente 1 mL foram injetados com auxílio da bomba de seringa acoplada ao equipamento NanoSight, modelo L10 (Malvern Panalytical) presente na Plataforma de Microscopia do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz). A análise foi realizada no programa NTA V.3.4.3. Os vídeos foram processados após aquisição com laser verde (comprimento de onda = 532 nm) em câmera sCMOS operando a 30 quadros por segundo. Foram analisados 3 vídeos (replicatas técnicas) de 60 segundos para cada fração. O parâmetro de nível da câmera foi ajustado para 12, e a contagem das partículas foi feita em um limite de detecção de partículas ajustado em 5. Os dados resultantes foram plotados em gráficos com o auxílio do programa PRISM 5.0

4.3. Isolamento das VEs das amostras clínicas

A SEC foi a metodologia escolhida para isolamento das VEs, para posterior análise proteômica. O preparo das colunas e a cromatografia, foram realizados como descrito em 4.2.4. Amostras de plasma de pacientes e de doadores saudáveis (500 µL) foram previamente preparadas, sob descongelamento brando e posterior adição do inibidor de proteases Mini Complete - EDTA *free* (Roche) na proporção 1:50 (v/v), seguido de centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos para garantir a ausência de *debris* celulares. A SEC foi realizada com 400 µL de cada amostra. Ao final da cromatografia, as frações foram dosadas em absorvância a 280nm e posteriormente armazenadas a -20°C.

4.4. Quantificação e determinação de tamanho das VEs por NTA

Após isolamento das VEs das amostras dos grupos experimentais através da SEC, as frações enriquecidas de VEs foram analisadas por NTA no equipamento NanoSight modelo NS300 (Malvern Panalytical) disponibilizado no Laboratório Científico da PensaBio. Cerca de 200 µL do *pool* das frações de 6 a 11, foi diluído 5X em PBS para análise, realizada no programa NTA V.3.4.3 (106). Os vídeos foram processados após aquisição com laser azul (comprimento de onda = 488 nm) em câmera sCMOS operando a 30 quadros por segundo. O parâmetro de nível da câmera foi ajustado para 12, de modo que todas as partículas estivessem distintamente visíveis, não excedendo a saturação do sinal acima de 20% para todas as amostras. Foram obtidos 3 vídeos (replicatas técnicas) de 60 segundos para cada amostra, e a contagem das partículas foi feita em um limite de detecção de partículas ajustado em 5. Os dados resultantes foram plotados em gráficos com o auxílio do programa PRISM 5.0.

4.5. Preparo das amostras para espectrometria de massas.

Para cada amostra, uma alíquota de 1,5 mL do pool de frações enriquecidas com VEs foi submetido ao concentrador à vácuo (Speed Vac® Plus SC210A, Savant), e ressuspensas em 50 µl de bicarbonato de amônio 50 mM + 0.2% de agente surfactante Rapigest (Waters). Após nova centrifugação a 20,000 x g por 5 min, a concentração de proteínas foi estimada pela leitura de 2 µL em absorvância a 280 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Aproximadamente 30 µg de cada amostra foram reduzidas com 5

mM de ditioneitol (DTT) a 37 °C por 3 h. Em sequência, as amostras foram alquiladas com 15mM de iodoacetamida (IAA) 15 min, no escuro, à temperatura ambiente. A tripsina (Promega) foi adicionada na proporção 1:50 (m:m) de enzima para substrato, e a digestão enzimática foi realizada overnight a 37 °C. Ao final, a reação foi interrompida com 1% ácido trifluoroacético (TFA).

Os peptídeos resultantes foram dessalinizados em micro colunas de fase reversa, montadas com resina C8/C18 (POROS R2, Applied Biosystems). Brevemente, ponteiras de 10 µL e membranas EMPORE C8 (3M) foram usados para empacotamento de 10 µL de resina, preparados no laboratório. As micro colunas foram previamente equilibradas com 10 µL de TFA 1% (v/v); seguido da aplicação das aplicadas. Posteriormente, foram feitas 2 lavagens com 10 µL TFA 0,1% (v/v). Os peptídeos foram eluidos em 20 µL de TFA 0,1% (v/v) em 70% (v/v) de acetonitrila. Ao final, as amostras foram submetidas ao concentrador a vácuo e ressuspensas em 20 µL de ácido fórmico a 1%. A concentração dos peptídeos purificados foi observada por leitura de 2 µL de amostra em absorvância a 280 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Todas as amostras foram normalizadas para aproximadamente 0,250 µg/µL e armazenadas a -20 °C para posterior análise por nanocromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (nLC-MS/MS) (Figura 4.2A, B e C).

4.6. Nanocromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (nLC-MS/MS)

De modo geral, o fluxo de análise nLC-MS/MS compreende os passos descritos a seguir e representado na Figura 4.2 (87,107,108).

- i. Nanocromatografia: os peptídeos, em solução ácida (protonados), são bombeados através de uma coluna capilar de fase reversa, com o auxílio de um cromatógrafo (Etapa D, Figura 4.2). Nesta cromatografia, os peptídeos são separados de acordo com sua hidrofobicidade. A coluna tem extremidade distal afilada que é 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, método de ionização conhecido como *Eletrospray*.

- ii. As determinações da razão massa sobre carga dos analitos, acontecem no analisador de massas tipo *Orbitrap* (etapa D figura 4.2). Este analisador consiste em 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*.(109,110).
- iii. Numa primeira varredura, determina-se o valor e a intensidade da razão massa/carga dos íons peptídeos íntegros em espectros MS1. No modo de operação “Análise Dependente do Dado” os íons mais abundantes de cada varredura são selecionados e fragmentados em uma câmara de colisão (do tipo HCD = *higher-energy collision dissociation*) com moléculas de um gás inerte
- iv. Os íons-fragmentos resultantes também são analisados no *Orbitrap* que, nesta segunda varredura, irá determinar o valor e intensidade da razão massa/carga destes fragmentos gerando espectros MS2.
- v. Os dados gerados (espectros MS1 e MS2) são usados para análises computacionais para identificação dos peptídeos e inferência das proteínas (Etapa E, figura 4.2).

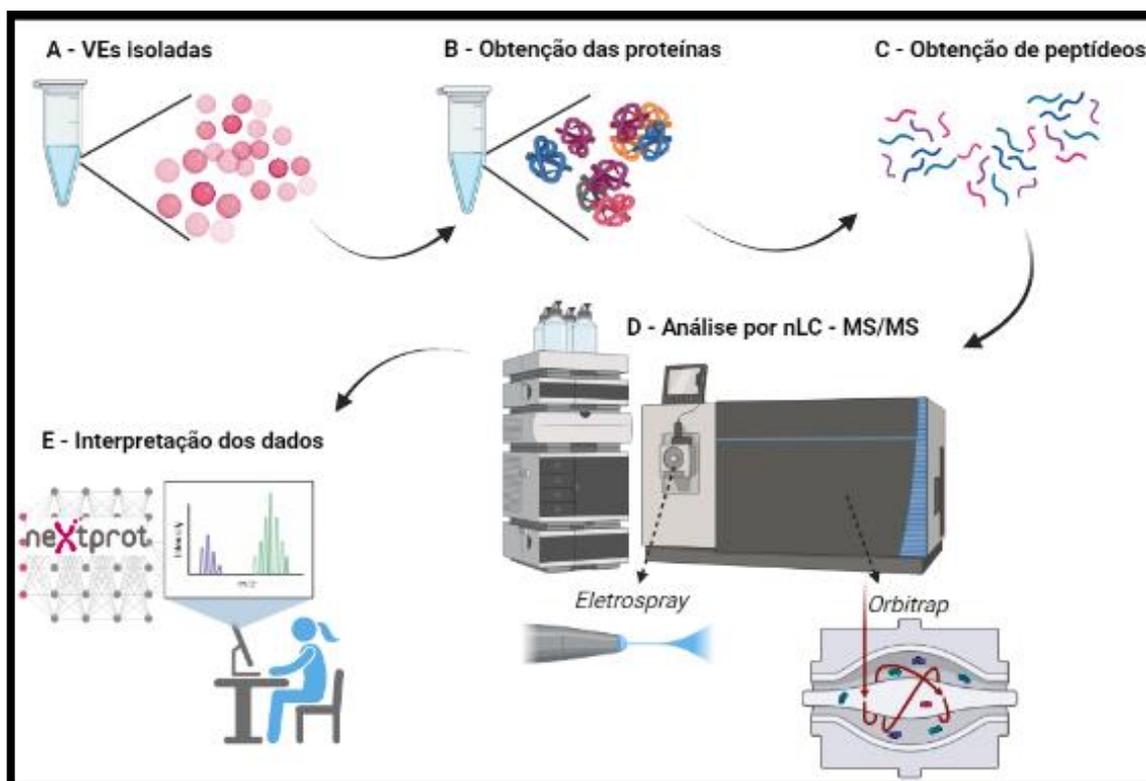


Figura 4.2 - Fluxo de trabalho da abordagem proteômica *shotgun*. A partir do volume coletado e enriquecido com VEs, obtido nas frações de 6 a 11 da SEC, as VEs são lisadas com auxílio de agente surfactante, e as proteínas obtidas passam pelo processo de digestão para obtenção de peptídeos tripticos. Após preparo dos peptídeos, as amostras são inseridas no sistema de nanocromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Os peptídeos que eluem da cromatografia são ionizados e passam ao estado gasoso por tecnologia de Eletrospray. No espectrômetro de massas, os peptídeos são analisados e a razão massa sobre carga é determinada, tanto para os íons peptídeos íntegros, como os íons fragmentos. Os espectros de massas resultantes das análises são utilizados por ferramentas de bioinformática, para identificação dos peptídeos e remontagem das proteínas.

Para execução da nLC–MS/MS, os peptídeos (cerca de 1 µg por amostra) foram separados com o auxílio do cromatógrafo Dionex UHPLC™ e analisados no espectrômetro de massas Q Exactive HF-X (Thermo Scientific). Cada amostra foi analisada em triplicatas técnicas. A cromatografia foi realizada no total de 190 minutos, onde os peptídeos foram carregados em FA 0,1% (v/v) e ACN 2% (eluente A) em uma coluna capilar de 38,5 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno (PicoFrit™ Self-Pack), e ponta de 10 µm (New Objective), empacotada com sílica de 1,9 µm ReproSil-Pur 120 C18-AQ (MAISCH/Alemanha). Os peptídeos separados foram eluídos sob gradiente de FA 0,1% (v/v) em 2 a 40% de ACN (eluente B) por 152 minutos, seguido de 40 a 80% em 2 minutos e a lavagem a 80% em 2 minutos.

Os espectros de massas dos íons precursores (*full scan* MS1), foram adquiridos no analisador do tipo *Orbitrap*, com resolução de 60.000 em uma janela (*Scan range*) de 350 a 1.400 m/z. Seguindo a abordagem de análise dependente de dado (*Data Dependent Analysis* - DDA), os 20 íons precursores mais intensos de cada *scan* MS1 foram sequencialmente selecionados com uma janela de isolamento de 1,3 m/z para fragmentação por dissociação induzida por colisão (HCD). A obtenção dos espectros dos íons fragmentos (MS2), foi realizada no mesmo analisador *Orbitrap*, com resolução de 15.000. O tempo de permanência de um íon na lista de exclusão (exclusão dinâmica) foi de 30 segundos. Os espectros gerados (dados brutos) foram obtidos utilizando o programa Xcalibur (versão 4.2.47).

4.7. Análise Computacional I – Identificação, Quantificação E Classificação Molecular Do Proteoma Das VEs.

4.7.1. Identificação dos peptídeos e inferência das proteínas.

A identificação dos peptídeos foi realizada através método de combinação de espectros de peptídeo (PSM do inglês: *Peptide Spectrum Matching*). Resumidamente, essa estratégia consiste na comparação *in silico* dos espectros MS2 obtidos experimentalmente (dados brutos) com espectros projetados de sequências presentes em banco de dados. Esse processo foi realizado utilizando o algoritmo *Comet*, dentro do ambiente computacional *PatternLab For Proteomics* versão 4.0. As buscas foram realizadas contra o banco de dados *Nextprot* contendo 42.135 sequências de proteínas, (<http://www.nextprot.org/>), incluindo 137 contaminantes comuns (e.g., tripsina, queratina), além de sequências proteicas invertidas, formando um banco reverso (estratégia *target-decoy*) (111,112).

Para as buscas, foram determinados os seguintes parâmetros: consideração de peptídeos trípticos e semi-trípticos com até 2 sítios de clivagem perdidos; massas entre 500 e 5.000 Da; modificações carbamidometilação (Cys) fixa e oxidação da metionina (Met) variável; tolerância inicial de 40 ppm para íons precursores. Os demais parâmetros seguem às orientações de valores do *Comet* para dados adquiridos em analisadores de alta resolução.

A etapa de filtragem dos PSMs foi realizada no módulo *Search Engine Processor* (SEPro) do PatterLab. Os valores das métricas de identificação XCorr, DeltaCN, DeltaMass, Z-score, número de picos correspondentes e valores de classificação secundária, foram usados para gerar um discriminador bayesiano, e uma pontuação de corte foi estabelecida para aceitar uma taxa de descoberta falsa (FDR) menor que 1% com base no número de identificações *decoy* (identificações feitas com base nas sequências invertidas). Foi necessário um comprimento mínimo de sequência de seis resíduos de aminoácido por peptídeo. Para a lista final de proteínas, aplicou-se o conceito da máxima parcimônia e somente as proteínas que possuíam ao menos 1 peptídeo único foram consideradas para as análises seguintes.

4.7.3. Quantificação *label-free* por *Spectral Counting* – Distribuição Das Proteínas E Diferença De Abundância Entre Os Grupos De Análise.

Para avaliar a abundância diferencial das proteínas entre os grupos biológicos, foi adotada uma estratégia rápida, reprodutível e precisa, que não requer marcação prévia das amostras (livre de marcação, do inglês *Label-free*), que compreende na simples correlação do número de espectros de massas dos íons fragmentos obtidos (MS2) associados a uma determinada proteína, inferindo sua abundância relativa na amostra (Contagem de espectros, do inglês *Spectral Counting*)(113).

Para esta análise, os arquivos *.SEpro* referentes a cada amostra foram organizados em diretórios de acordo com os grupos biológicos e carregados no módulo *Project Organization* do PatternLab. A comparação entre os grupos biológicos para determinação das proteínas diferencialmente reguladas foi feita em duas etapas: “pacientes” vs “controles” e “choque” vs “sepsis”. As condições para associação dos espectros de massas às proteínas foram: Quantificação de proteínas e Contagem de espectros de peptídeos únicos.

O arquivo matriz correspondente a abundância das proteínas em todas as amostras (.plp) foi utilizado para gerar um diagrama de Venn, considerando-se a distribuição das proteínas presentes em ao menos 2 amostras por condição biológica. Por definição, o diagrama expõe as proteínas que estão presentes em apenas uma condição biológica (consideradas exclusivas) e as proteínas compartilhadas em mais de uma condição biológica (grupo de intercessão). Apesar de não ser possível calcular a significância

estatística destas proteínas exclusivas, elas foram consideradas nas etapas seguintes e adicionadas às listas de proteínas diferencialmente abundantes.

Os valores de quantificação das proteínas do grupo de intercessão são utilizados para o calcular a razão (\log_2) entre as abundâncias (*fold change*), determinando a diferença de expressão; e a significância estatística, através do *q*-valor (valor *p* do teste t em $-\log_2$) destas diferenças. O resultado é visualizado no módulo TFold, em um gráfico do tipo *volcano plot*. A lista final de proteínas diferencialmente abundantes é montada conforme a Figura 4.3.

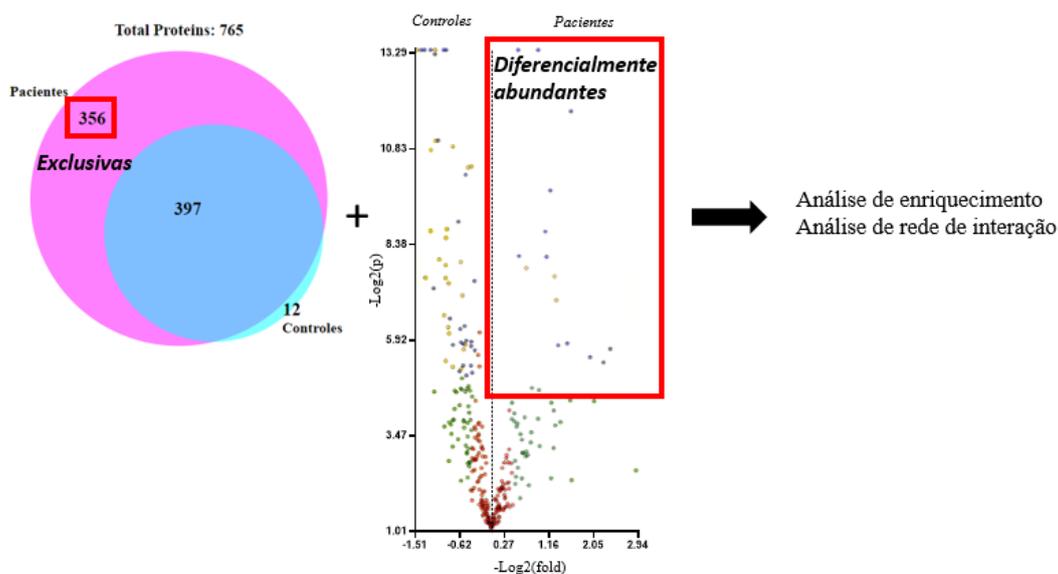


Figura 4.3 – Montagem da lista de proteínas diferencialmente abundantes. A lista é composta pelas proteínas consideradas estatisticamente mais abundantes em uma condição biológica pela análise de TFold + proteínas exclusivas pela distribuição no diagrama de Venn, nesta mesma condição biológica. Estas listas são posteriormente utilizadas em ferramentas de análise de enriquecimento de vias bioquímicas e de redes de interação proteína-proteína (P.P.I).

4.8. Análise Computacional II – Inferência Sobre Mecanismos Biológicos.

As listas de todas as proteínas com os identificadores referentes ao banco de dados Nextprot foram convertidos em seus respectivos *Gene Names* pela ferramenta *Retrieve/ID mapping* do UniProt (114). As listas foram adicionadas ao programa FunRich para classificação nos termos de componentes celulares. Essa ferramenta utiliza os bancos de dados *Gene Ontology* (geneontology.org), *HPRD 2* (hprd.org), *Entrez Gene 3* (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) e *UniProt* (uniprot.org) para determinar as anotações

quanto a processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares de acordo com o proteoma de referência selecionado (115). Adicionalmente, a mesma lista foi submetida ao banco de dados Vesiclepedia (116) para avaliação do proteoma conhecidamente associado a VEs.

Utilizamos a base de dados do Reactome DB (reactome.org) (117) e a ferramenta NetworkAnalyst (networkanalyst.ca/NetworkAnalyst) (118) para análise de enriquecimento de vias. Para análises de interação entre proteínas (PPI), utilizamos o programa Cytoscape (119) com os aplicativos de previsão PPI STRING Interactome (120). O grau de perturbação molecular (<https://mdp.sysbio.tools/>) (121) das amostras foi calculado utilizando a matriz os dados quantitativos correspondentes à abundância das proteínas em todas as amostras.. Os *heat maps* foram criados utilizando a ferramenta Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca>) com os valores normalizados pelo z-score através da fórmula: $\text{abundância} - \text{valor médio} / \text{desvio padrão da abundância}$ (122).

5. Resultados

5.1. Características da Coorte

A gravidade dos pacientes, estabelecida através do escore clínico SOFA, apresentou as médias de pontuação no escore para o grupo sepse de 2,7 (D.P. 4,05) e choque séptico de 7,2 (D.P. 1,09) no primeiro dia de internação. Os sítios de infecção dos pacientes foram: pulmonar (4 pacientes com sepse e 4 pacientes com choque); trato urinário (4 pacientes com sepse e 2 com choque), sanguíneo (1 paciente com choque) e outros (1 paciente sepse e 2 com choque). Nos grupos de sepse e choque séptico, a idade média foi de 48,5 (\pm 9) e 52,5 (\pm 10,5) anos, respectivamente, enquanto a média grupo controle foi de 48,4 (\pm 8) anos (Tabela 5.1). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação às idades dos pacientes e controles.

Tabela 5.1 – Relação dos pacientes e controles com suas respectivas características, sítios de infecção, gravidade e desfecho. D.P.- Desvio Padrão.

	Sepse N=9	Choque N=9	Controle N=9
Idade	48,5 (\pm 9)	52,5 (\pm 10,5)	48,4 (\pm 8)
Sexo (Masculino/Feminino)	4/5	4/5	4/5
Sítios de Infecção:			
Pulmonar	4	4	-
Trato urinário	4	2	-
Sanguíneo	-	1	-
Outros	1	2	-
SOFA 1ª coleta (D.P.)	2,7 (4,05)	7,2 (1,09)	-
Desfecho (alta/óbito)	9/0	8/1	-

5.1.1 Desempenho das Técnicas de Isolamento das VEs do Plasma.

O primeiro método testado para isolamento das VEs de plasma foi a centrifugação seriada (CS). Para tal, 1 mL de plasma de 4 doadores saudáveis foram centrifugados em três ciclos a 16.000 x g por 2 h 30 min. Após digestão trípica de 50 μ g de proteínas e purificação dos peptídeos em microcolunas de fase reversa, as amostras foram analisadas por nanocromatografia líquida, acoplada ao espectrômetro de massas de alta resolução (Easy nLC II – LTQ-Orbitrap XL, Thermo Scientific). Utilizando o programa PatternLab 4.0, foi possível identificar peptídeos, com alto grau de confiança (FDR < 1), e inferir o número de proteínas pelo princípio da máxima parcimônia (Tabela 5.2). Em cada uma das 4 amostras dos doadores saudáveis, somamos todos os PSM (espectros associados às

proteínas inferidas) referentes a identificação de albumina e observamos aproximadamente 25% do total de PSMs refere-se a esta proteína plasmática.

Tabela 5.2 - Resultados da análise proteômica de VEs isoladas por CS em testes prévios.

	CS
MSpecs (PSM)	68.066
Peptídeos	6.323
Proteínas (máx. parcimônia).	621
MSpecs-Albumina	17.053

Albumina é a proteína mais abundante do plasma (123) e a identificação desta proteína em um quarto de todos os espectros identificados, poderia suprimir a identificação de proteínas diretamente relacionadas às VEs, foco deste estudo. Assim, a SEC foi testada como método alternativo para isolamento das VEs. Segundo Böing e colaboradores, as VEs são separadas das proteínas plasmáticas principalmente entre as frações 9 a 12, dentre 26 frações sequenciais de 0,5 mL cada (124). Para proceder um teste acerca desse método de isolamento para fins de análise proteômica de VEs, 1 mL de plasma foi submetido à separação das VEs por SEC, em coluna de 10 mL montada no laboratório. Para determinar em quais frações as VEs estavam sendo eluídas, as frações de 1 a 16 foram submetidas à análise por citometria de fluxo, utilizando como marcador a Anexina V+ (curva azul na figura 5.1). A anexina V é utilizada para marcar especificamente a fosfatidilserina exposta na superfície das VEs.

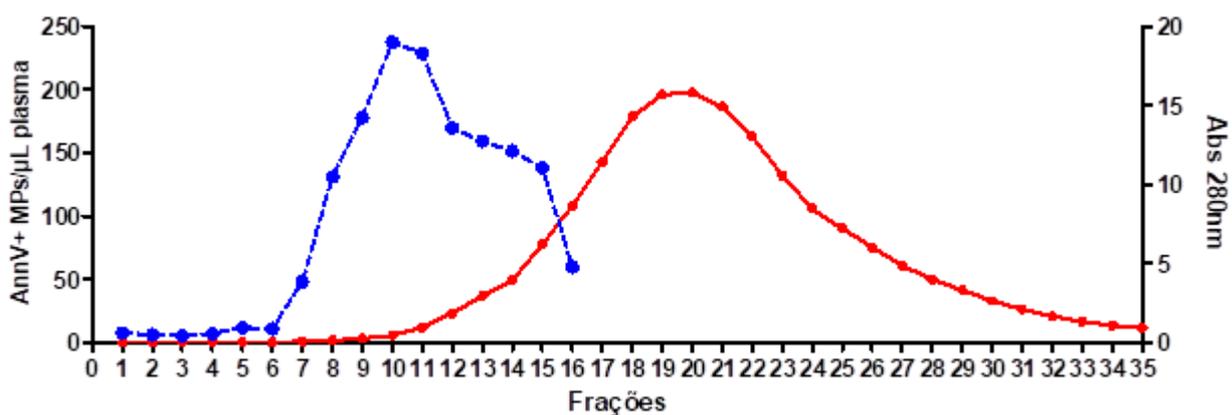


Figura 5.1 - Perfil de eluição de 1,0 mL de plasma humano de doador saudável em coluna PD10 (GE Healthcare) empacotada com resina CL-2B (Sigma Aldrich). A eluição aconteceu ao longo

de 35 frações com aproximadamente 500 µL cada. A curva vermelha representa a leitura da absorbância a 280 nm (eixo y direito) referente a proteínas do plasma, de 2 µL de cada fração. A curva azul representa a concentração de VEs detectadas através da marcação de Anexina V+ (eixo y esquerdo) por citometria de fluxo.

A figura 5.1 demonstra que as VEs começam a eluir a partir da fração 6, com pico entre as frações 10 e 11, enquanto as proteínas plasmáticas são eluídas a partir da fração 10, corroborando com dados previamente publicados (124). Adicionalmente, para avaliar a reprodutibilidade da SEC, a cromatografia foi repetida com uma coluna previamente utilizada e em colunas novas, montadas da mesma maneira, com amostras de plasma de doadores diferentes (Figura 5.2). Curiosamente, o perfil de eluição das proteínas foi reprodutível quando as colunas são usadas pela primeira vez. Entretanto, observamos que o perfil de eluição da cromatografia apresenta um deslocamento, quando a coluna é utilizada uma segunda vez, possivelmente deslocando também a eluição de VEs. Este perfil não muda a partir da terceira corrida cromatográfica, permanecendo deslocado (Dado não mostrado). Dessa maneira, decidimos montar uma coluna nova para cada amostra a ser analisada. Isto não só evitou o deslocamento do perfil inicial de eluição, mas também uma possível contaminação cruzada entre amostras.

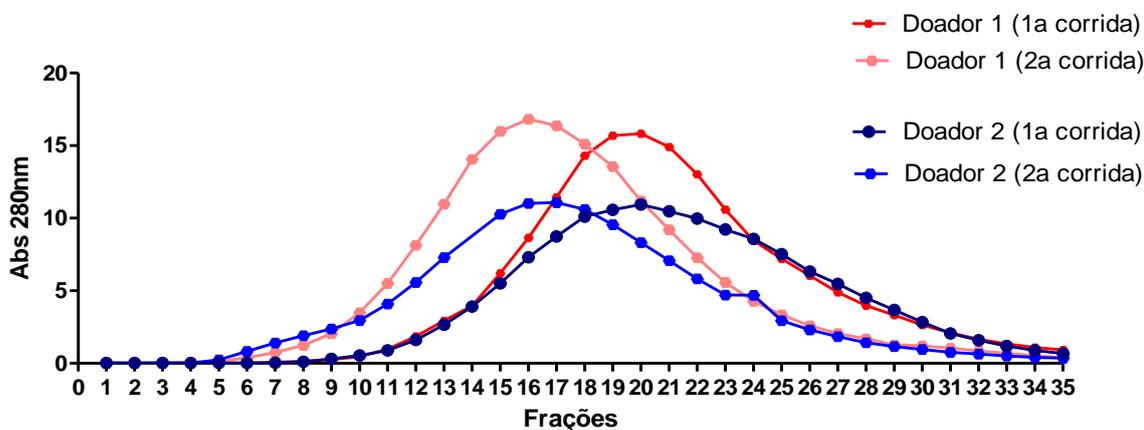


Figura 5.2 – Perfil de eluição de 1,0 mL de plasma de doadores saudáveis em coluna PD10 reutilizada (segunda corrida) ou em coluna nova (2ª corrida). A curva vermelha e curva azul marinho, representam as primeiras corridas e demonstram um perfil semelhante ao observado nos testes anteriores. A curva rosa e a curva azul representam as segundas corridas em colunas já utilizadas, ambas deslocando o perfil de eluição das proteínas plasmáticas.

Para determinar a proporção de proteínas plasmáticas, especialmente albumina, contidas em cada fração, as frações de 1 a 14 foram submetidas à análise por espectrometria de massas. As frações 1 a 5 foram unidas em um *pool* devido à baixa concentração proteica, e analisadas juntas, enquanto as demais frações foram analisadas individualmente. A Tabela 5.3 demonstra os dados de identificação por espectrometria de massas. Observamos que o número de espectros relacionados à identificação de albumina aumenta em cerca de 3 vezes da fração 11 para a fração 12 (11 = 443 espectros; 12 = 1597 espectros). De maneira complementar, foi observado que os espectros associados a apolipoproteínas também possuem uma contribuição importante nas identificações, chegando a obter 24% dos espectros obtidos entre as frações de 8 a 10, e do total de espectros associados a apolipoproteínas, a ApoB100, principal constituinte da LDL, é proteína com maior contribuição nas identificações, seguido pela ApoA-I e A-II, constituintes comuns da lipoproteína de alta densidade (HDL do inglês: High Density Lipoprotein).

Tabela 5.3 – Números absolutos dos dados da análise proteômica das frações da SEC. Relação de espectros de massas (MSpec), peptídeos, proteínas totais e com base no conceito de máxima parcimônia, espectros referentes a albumina e apolipoproteínas, obtidos após as análises por MS (FDR combinado inferior a 1%).

Frações	1_5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MSpec	1.252	1.585	4.637	5.826	7.978	6.001	9.314	10.019	10.053	16.804
Peptídeos	531	536	1345	1776	2069	1754	2254	2496	2457	2749
Proteínas	224	228	287	306	321	285	292	305	324	369
Proteínas (MaxPars)	88	85	125	118	135	141	167	175	198	198
MSpecs Albumina	63	565	698	503	168	278	443	1.597	1.777	5.672
MSpecs Apolip. (Total)	4	56	644	1.440	1.870	1.469	1.432	1.344	1.162	1.735

MSpecs	-	33	431	969	1.323	1.086	1.019	944	769	1.069
ApoB-100										
MSpecs										
ApoA-I e	2	20	68	111	144	133	160	173	199	360
A-II										

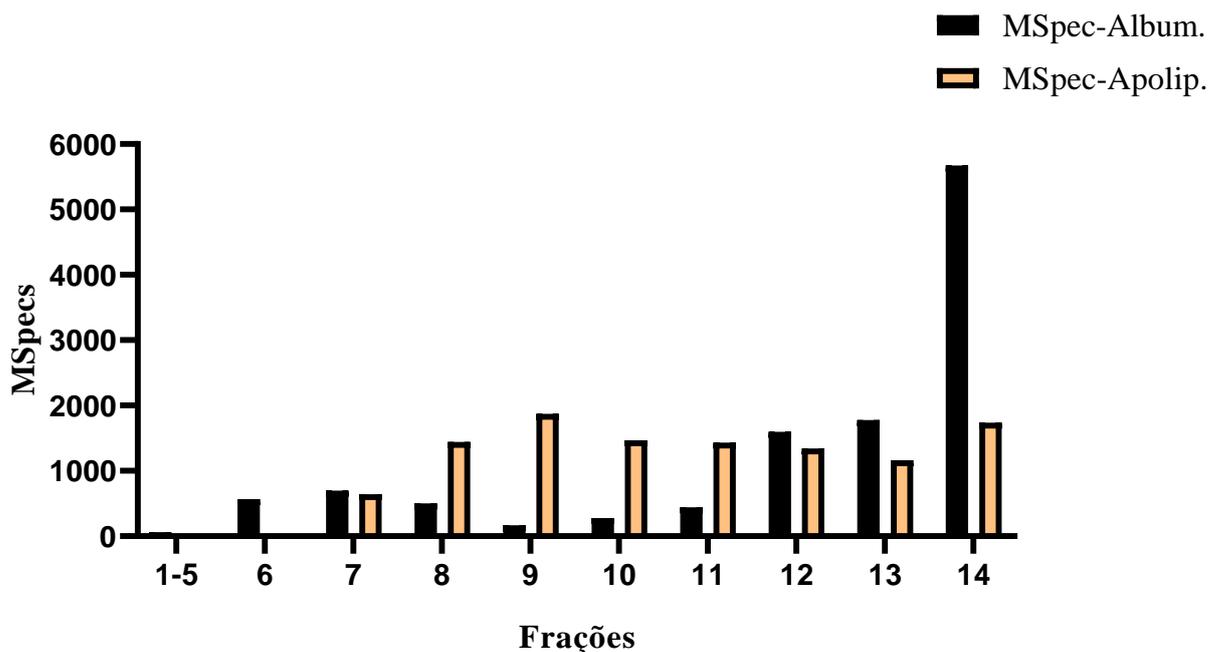


Figura 5.3 - Número de espectros referentes a albumina (preto) e apolipoproteínas (laranja). A fração 11 corresponde a 443 espectros referentes à albumina enquanto nas frações 12, 13 e 14 este número corresponde a 1597, 1777 e 5672, respectivamente. Os espectros referentes a apolipoproteínas está presente de forma regular entre as frações de 7 a 14.

As apolipoproteínas são proteínas constituintes estruturais e funcionais das lipoproteínas, estruturas carreadoras de lipídeos no organismo (125). Mais especificamente, a proteína ApoB100, que obteve o maior número de espectros associados nos testes anteriores, é o principal constituinte proteico da lipoproteína LDL (126). Sabe-se que o tamanho e a densidade das lipoproteínas podem se sobrepor ao das VEs dependendo do método de isolamento escolhido (44). Por essa razão, antes da purificação das VEs, foi testada a adição de uma etapa de separação de LDL por ultracentrifugação com gradiente de densidade bifásico.

Os resultados da análise proteômica (Tabela 5.4) permitiram comparar os métodos de isolamento, quanto aos números absolutos de identificação de espectros (PSMs), peptídeos e proteínas, e a distribuição de espectros associados à albumina e à apolipoproteínas. Também foram avaliadas as diferenças no preparo e manipulação das amostras, além do tempo de processamento. Adicionalmente, comparamos as proteínas identificadas com o banco de dados de proteínas associadas às VEs (Vesiclepedia). O proteoma de VEs isoladas pela SEC obteve o melhor desempenho entre os critérios avaliados. A adição do passo de ultracentrifugação com gradiente de densidade bifásico, apesar de reduzir a identificação de espectros associados a apolipoproteínas, permitiu um aumento da identificação de espectros associados a albumina, além de não acrescentar vantagens quanto ao número de identificações proteicas, desse modo, a SEC foi escolhida como o método mais apropriado para o isolamento de VEs de plasma, para posterior análise proteômica (Figura. 5.4).

Tabela 5.4 - Número de peptídeos identificados e proteínas inferidas na análise proteômica de VEs isoladas pelos 4 métodos testados.

	CS	SEC	UG+CS	UG+SEC
MSspec (PSM)	144.551	153.038	155.834	129.191
Peptídeos	6.070	7.910	6.879	7.673
Proteínas (Máx. parcimônia)	336	407	369	416
Proteínas com (no mínimo) 1 peptídeo proteotípico	296	359	331	361
MSpec Albumina	38.970	30.388	85.525	41.632
MSpec Apolipoproteínas (Totais)	4.231	13.526	2.796	2.740
MSpec ApoA-I e A-II	1.098	1.595	1.456	1.439
MSpec ApoB-100	1.749	9.355	7	104

<p>A) CS</p> <p>Tempo: 9h Peptídeos: 6070 Proteínas: 336 Albumina 27% Apolipo. Total: 2,9% (<i>ApoB-100</i>: 1,21% <i>ApoA-I e A-II</i>: 0,76%) U Vesiclepedia: 83</p>	<p>B) SEC</p> <p>Tempo: 40 min. Peptídeos: 7910 Proteínas: 407 Albumina 19,9% Apolipo. Total: 8,8% (<i>ApoB-100</i>: 6,11% <i>ApoA-I e A-II</i>: 1,04%) U Vesiclepedia: 102</p>
<p>C) UG+CS</p> <p>Tempo: 12h Peptídeos: 6878 Proteínas: 369 Albumina 54,9% Apolipo Total: 1,9% (<i>ApoB-100</i>: 0,00% <i>ApoA-I e A-II</i>: 0,93%) U Vesiclepedia: 86</p>	<p>D) UG+SEC</p> <p>Tempo: 3h 40 min. Peptídeos: 7673 Proteínas: 416 Albumina 32,2% Apolipo Total: 2,1% (<i>ApoB-100</i>: 0,08% <i>ApoA-I e A-II</i>: 1,11%) U Vesiclepedia: 105</p>

Figura 5.4 - Desempenho das metodologias testadas para o isolamento de VEs das amostras experimentais. De acordo com os critérios: tempo de processamento; identificação de peptídeos e proteínas; correlação com o Vesiclepedia e identificação de espectros de proteínas interferentes. CS – Centrifugação Seriada; UG – Ultracentrifugação com Gradiente de Densidade Bifásico.

5.1.2 Reprodutibilidade das Cromatografias Realizadas nas Amostras dos Grupos de Análise.

Uma vez determinado o método mais apropriado para isolamento de VEs de plasma, 400µL de plasma das amostras de pacientes diagnosticados com sepse (n=9), choque séptico (n=9) e de doadores saudáveis (n=9) foram submetidos à SEC de modo pareado, processando uma amostra de cada grupo de análise por dia, no intuito de garantir condições semelhantes para cromatografia. O perfil de eluição das proteínas do plasma, representado na Figura 5.4, mostrou reprodutibilidade semelhante ao observado nos experimentos de padronização, onde as proteínas começam a eluir significativamente na fração 11, sinalizada na figura pelos traços em vermelho ao longo das imagens 5.4A a 5.4G. Adicionalmente, observamos que em dois grupos de amostras pareadas, houve um desvio na eluição das proteínas plasmáticas (Figura 5.4 H e I), e este desvio pode ter ocorrido também na eluição das VEs. Entretanto, para as amostras desta coorte, não foi possível analisar individualmente as frações para detecção de VEs especificamente. Portanto, as amostras pertencentes a esses grupos não foram analisadas por espectrometria de massas.

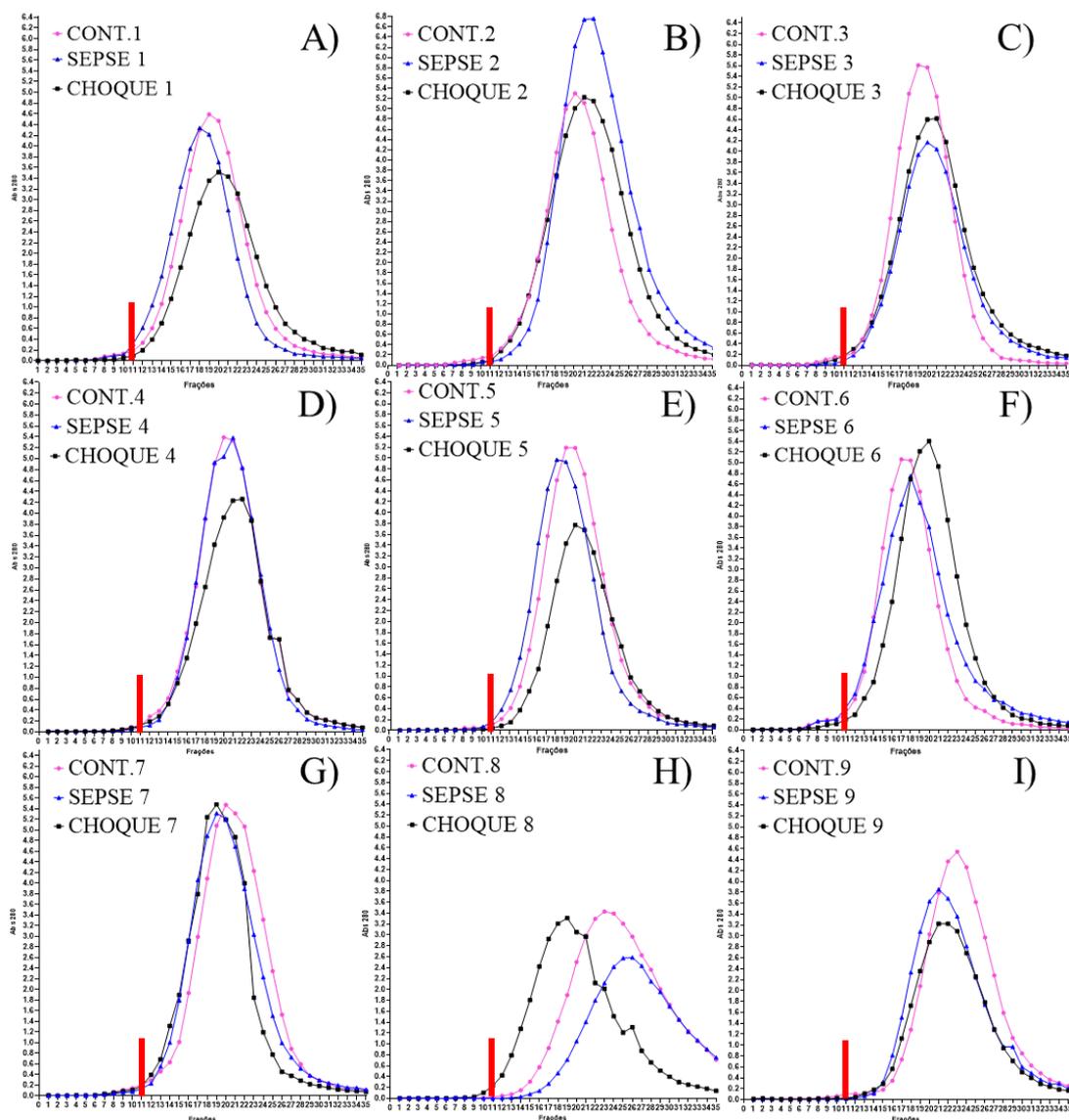


Figura 5.5 – Perfil cromatográfico de 0,4 mL de plasma submetidos a SEC. Cada fração possui aproximadamente 0,5 mL coletada manualmente. Entre os grupos de A – G, os perfis foram considerados reprodutíveis de acordo com o padrão observado nos testes. Os grupos H e I apresentam perfil deslocado, sendo excluídas das análises seguintes temporariamente. Eixo y: absorvância a 280 nm, valor mínimo 0,0 e valor máximo 6,4. Eixo x: Frações da SEC de 1 a 35.

5.1.3 Quantidade e Tamanho das Partículas Analisadas Entre as Amostras dos Grupos de Análise.

Em sequência, do pool de frações 6 a 11, foram utilizados cerca de 200µl para quantificação e determinação de tamanhos das VEs por NTA. A Figura 5.6 representa a concentração de VEs por amostra. A média de partículas quantificadas, entre todas as amostras, foi de $5,21 \times 10^9/\text{mL}$ (D.P. $2,61 \times 10^9$), desse modo é possível observar que as

amostras Choque 7; Sepse 2, Sepse 3, Sepse 6 e Controle 3, apresentaram concentrações que ultrapassam a faixa de valores dentro da média +/- um desvio padrão.

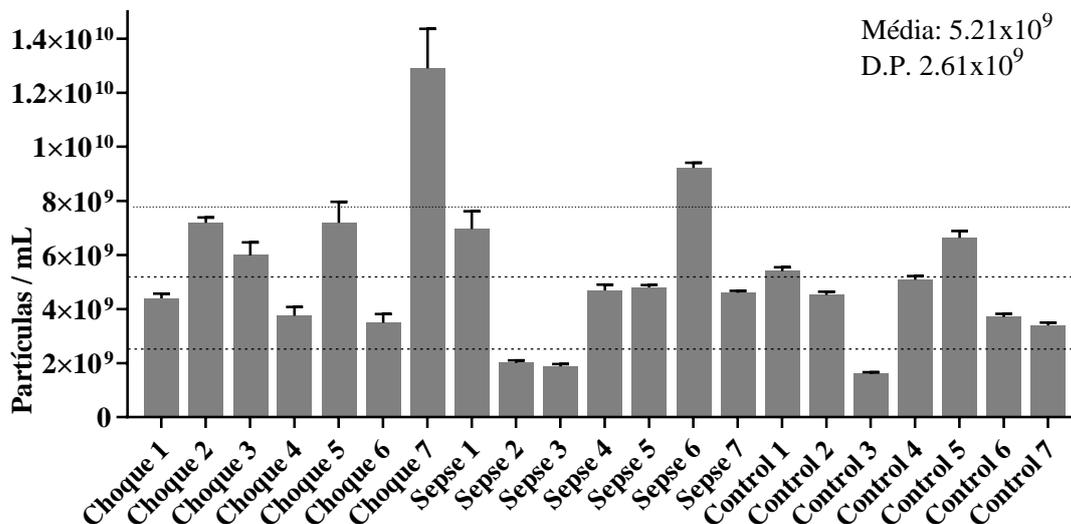
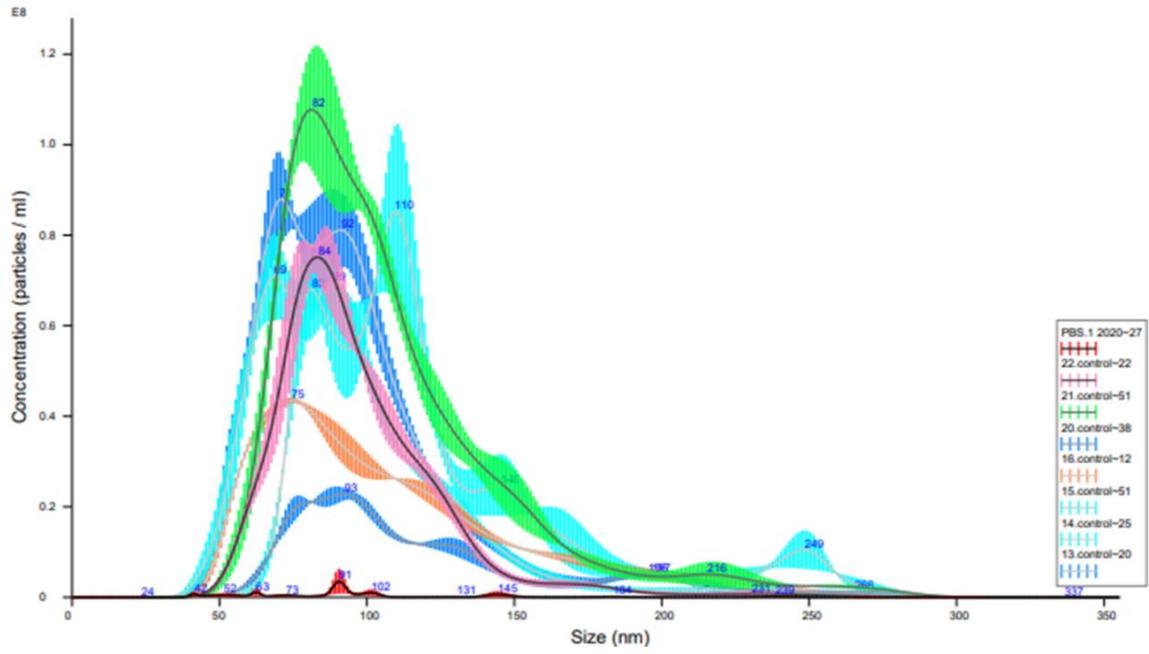


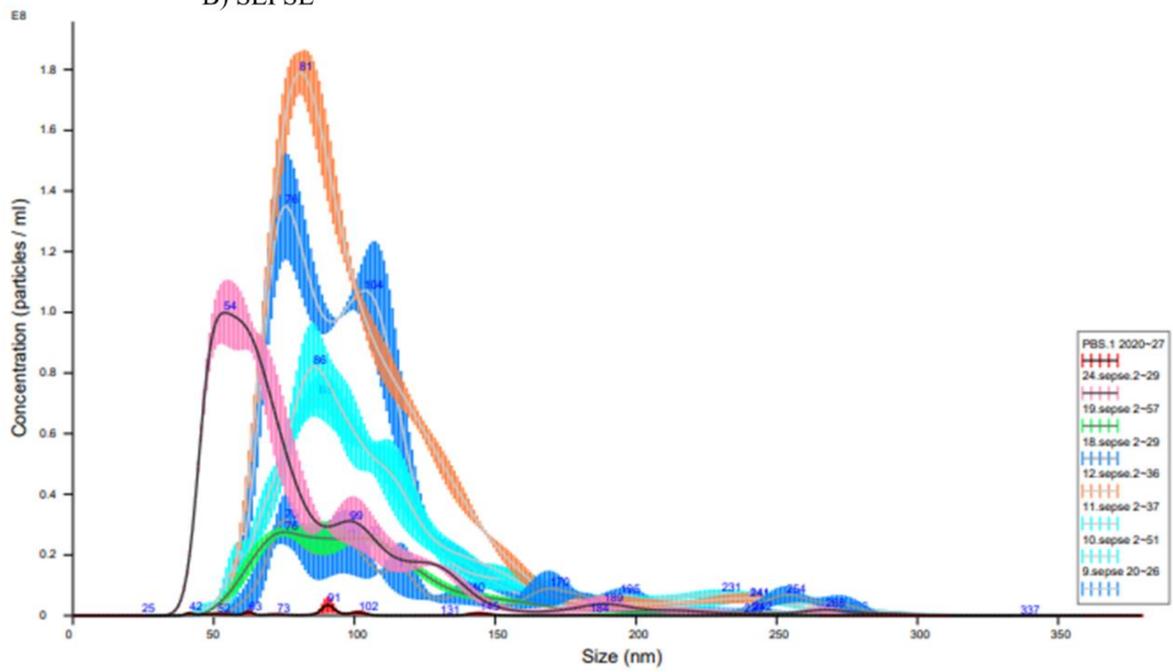
Figura 5.6 - Valores das médias de concentrações de VEs/mL com desvio padrão, das triplicatas técnicas, entre as amostras analisadas. A média total das partículas quantificadas foi de $5,21 \times 10^9$ /mL com desvio padrão de $2,61 \times 10^9$.

A seguir, avaliamos o tamanho das partículas detectadas por NTA em cada amostra. Os resultados das amostras separadas por grupos controle, seps e choque séptico estão representados na figura Figuras 5.7 A; B e C respectivamente. Foi possível observar que apesar da heterogeneidade entre as concentrações das amostras de um mesmo grupo de análise, as principais faixas de tamanho permanecem entre 50 e 150 nm nos três grupos. Em média, 87% das partículas de todas as amostras possuem tamanho inferior a 150 nm.

A) CONTROLES



B) SEPSE



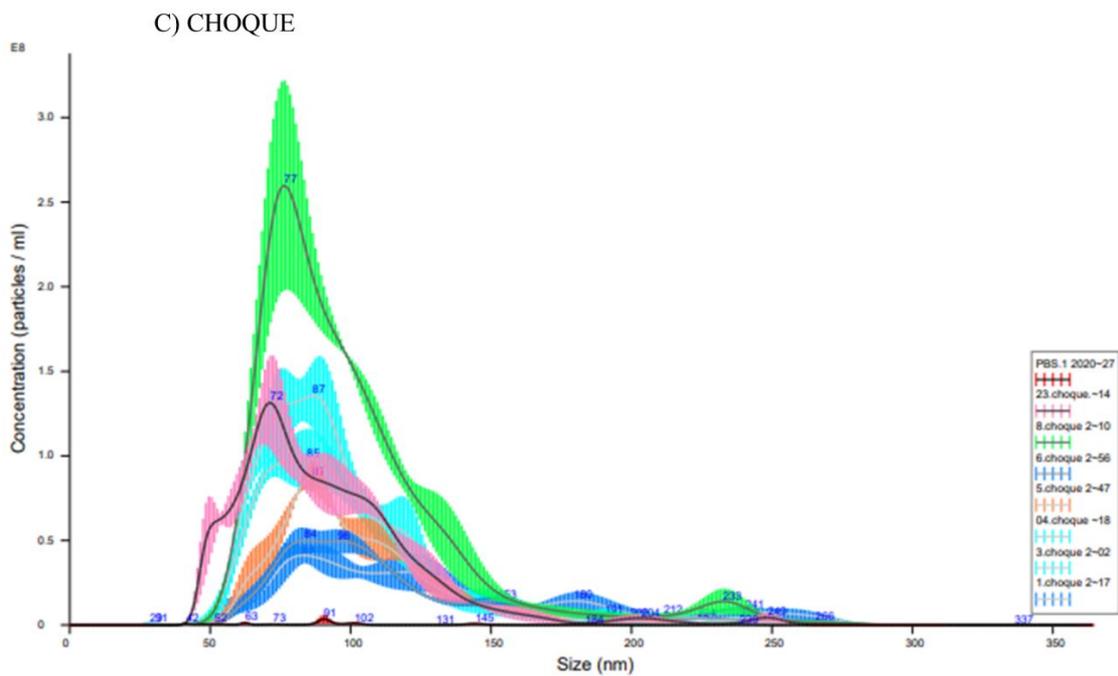


Figura 5.7 – Distribuição das faixas de tamanho das partículas quantificadas entre as amostras dos grupos de análise A) Controle, B) Sepse e C) Choque. Eixo y: Concentração (partículas/mL). Eixo x: Tamanho (nanômetro de diâmetro).

As diferenças de concentração das partículas entre os grupos de análise não possuem significância estatística, apesar das amostras do grupo choque possuírem a média mais elevada ($6,41 \times 10^9/\text{mL}$ D.P. $3,25 \times 10^9$) seguido pelo grupo sepse ($4,88 \times 10^9/\text{mL}$ D.P. $2,60 \times 10^9$) e controle ($4,33 \times 10^9/\text{mL}$ D.P. $1,62 \times 10^9$) respectivamente (Figura 5.8). O grupo sepse possui 3 amostras com valores fora da faixa entre a média +/- desvio padrão, enquanto os outros grupos biológicos possuem uma amostra fora da faixa. As amostras de valores mais discrepantes foram Choque 7 com a maior concentração ($12,9 \times 10^9/\text{mL}$) e Controle 3 com a menor concentração ($1,61 \times 10^9/\text{mL}$).

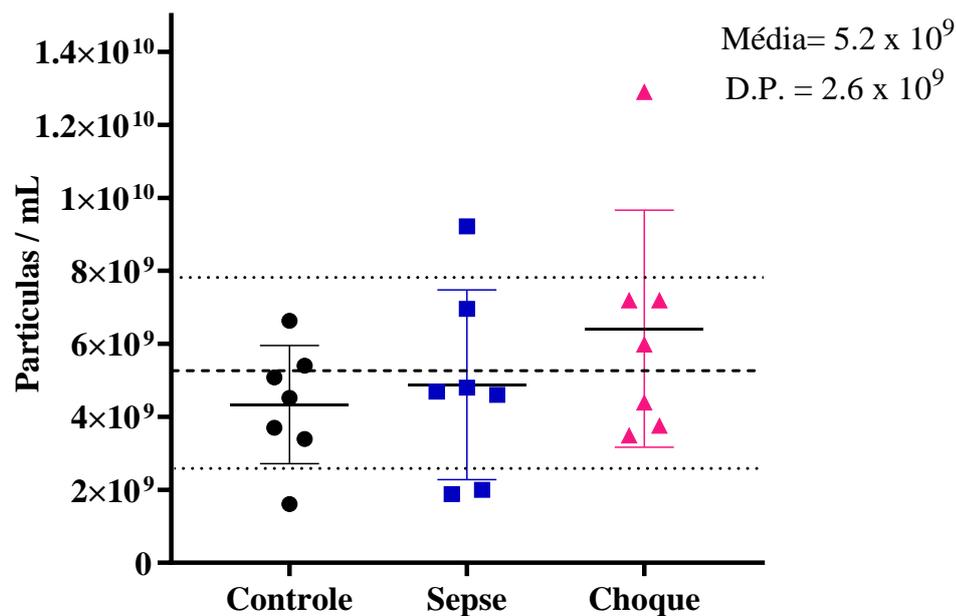


Figura 5.8 - Valores de individuais de VEes/mL entre os grupos Controle, Sepse e Choque. Não houve significância estatística entre os grupos de análise (P valor < 0.05).

5.1.4 Concentração de Proteínas Recuperadas Após a Lise das VEes.

Para cada amostra, foram utilizados 1,5 mL do *pool* das frações enriquecidas de VEes, para lise e extração de proteínas. Para tal, as amostras foram submetidas no concentrador à vácuo (Speed Vac® Plus SC210A, Savant), e ressuspensas em 50 μ L de RapiGest 0,1% em 50 mM NH_4HCO_3 . A quantificação foi estimada pela leitura de 2 μ L em absorvância a 280nm. Dada a intenção da análise quantitativa diferencial por espectrometria de massas entre as amostras, após a tripsinização de 30 μ g de proteínas de cada amostra, a concentração de peptídeos também foi estimada conforme descrito na Tabela 5.5. As concentrações foram normalizadas a fim de obter a quantidade de material ideal para análise de 1 μ g por corrida no LC-MS/MS.

Tabela 5.5 – Concentrações proteicas obtidas após a lise e tripsinização VEs.

	Proteínas (µg/µl)	Peptídeos (µg/µl)
Controle 1	1.856	0.707
Controle 2	1.085	0.511
Controle 3	0.699	0.581
Controle 4	1.517	0.563
Controle 5	0.608	0.330
Controle 6	0.827	0.360
Controle 7	0.751	0.390
Sepse 1	1.642	0.724
Sepse 2	0.299	0.340
Sepse 3	0.170	0.300
Sepse 4	0.166	0.170
Sepse 5	1.778	0.463
Sepse 6	1.380	0.819
Sepse 7	1.066	0.602
Choque 1	0.596	0.425
Choque 2	0.973	0.502
Choque 3	0.792	0.563
Choque 4	0.497	0.431
Choque 5	0.117	0.163
Choque 6	0.905	0.591
Choque 7	1.365	0.799

Avaliando a relação entre a concentração de VEs e de proteínas recuperadas após a lise das VEs, não foi possível observar uma clara associação direta, entre a concentração de partículas e proteínas, visto que, amostras com praticamente a mesma concentração de partículas apresentam concentração de proteínas distintas (Figura 5.9). Interessantemente, algumas amostras especialmente do grupo choque, se destacam pela concentração de proteínas inferior, comparado a amostras com semelhante ou maior quantidade de partículas nos outros grupos de análise.

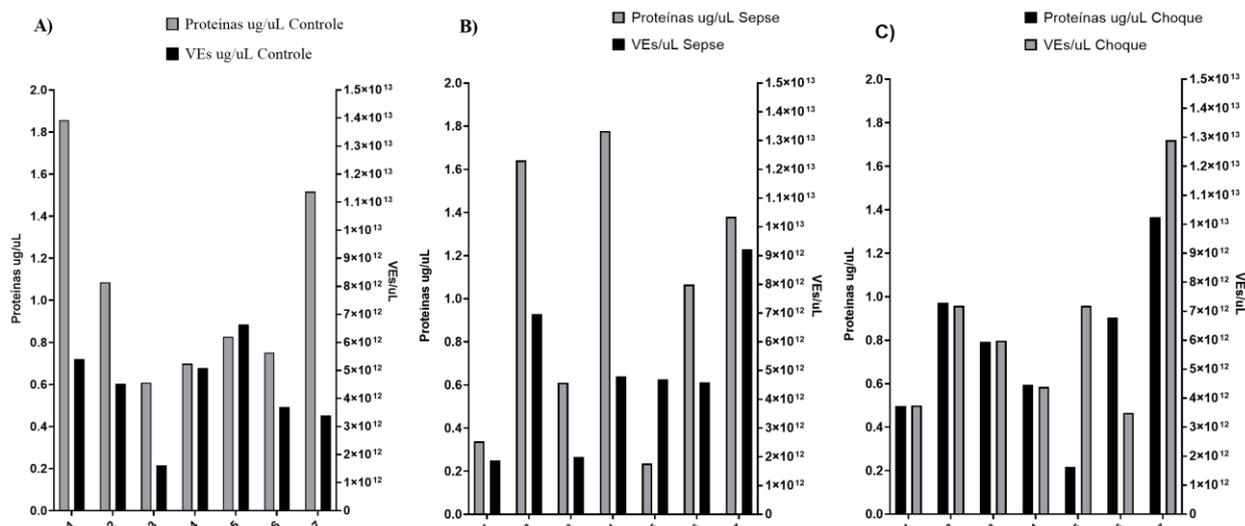


Figura 5.9 - Comparação da quantidade de VEs/µL e a concentração proteica obtida em µg/µl por amostra entre os grupos de análise A) Controle, B) Sepse e C) Choque. Gráficos em mesma escala de Proteínas/µL (eixo y esquerdo) de 0 a 2 µg/µL e Partículas/µL (eixo y direito) de 0 a 1.5x10¹³.

5.2. Identificações a Nível de Espectros, Peptídeos e Proteínas.

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 HF-X. A aquisição de cada amostras foi obtida em triplicatas técnicas, através de uma estratégia dependente de dados constituída por ciclos sucessivos onde os 20 íons precursores mais intensos, são selecionados para fragmentação seguida de nova aquisição. Após a aquisição dos espectros de massas, os dados brutos foram avaliados com auxílio da ferramenta Mass Spectra File Browser do PatternLab 4.0. A Figura 5.10 apresenta as médias das correntes iônicas totais (TICs) e a correlação com o número de peptídeos identificados em cada amostra. De modo geral, as amostras apresentaram um carregamento homogêneo e o desvio padrão foi 4,10x10¹², para os TICs e 1.811 para o número de peptídeos identificados.

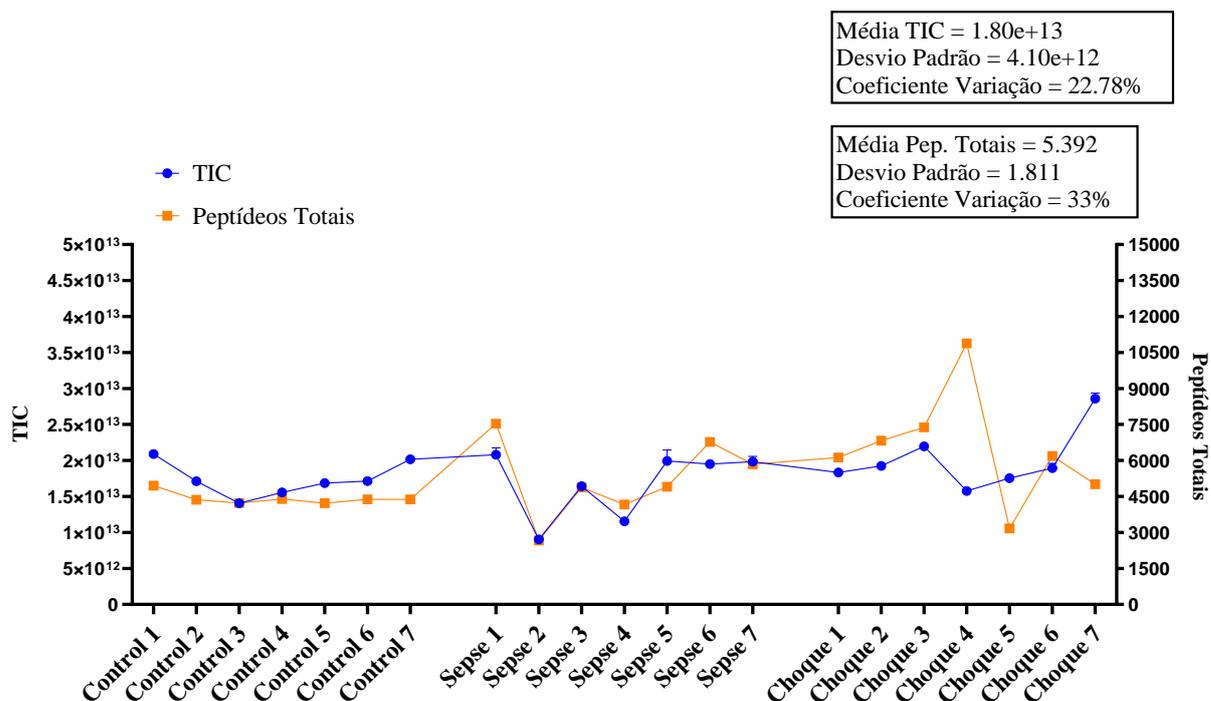


Figura 5.10 – Representação das correntes iônicas totais (*Total Ion Current* - TIC) e número absoluto de peptídeos identificados por amostra.

5.2.1. Identificações das proteínas no ambiente computacional PatternLab for Proteomics 4.0.

A busca e as identificações foram realizadas com o programa Comet dentro do ambiente computacional do PatternLab. Cada amostra possui 2 arquivos de identificação (duplicatas técnicas *.sqt*) que foram concatenados e filtrados pelo módulo SePro com alto grau de confiança: FDR <1 a nível de espectros, peptídeos e proteínas. Utilizando a ferramenta SePro Fusion, por condição biológica, foi possível identificar 7.989, 12.760 e 15.884 peptídeos nos grupos controle, sepse e choque, respectivamente. Em relação ao número de proteínas identificadas, observamos, utilizando o princípio da máxima parcimônia, 417, 640 e 919 identificações nos grupos controle, sepse e choque, respectivamente. Se considerarmos somente as proteínas identificadas com ao menos um peptídeo único (proteotípico), reportamos 384, 570 e 792 proteínas nos grupos controle, sepse e choque, respectivamente (Tabela 5.6). Com base nesses dados, optamos por prosseguir utilizando as listas de proteínas identificadas com ao menos um peptídeo único, visando a maior confiabilidade sobre a presença destas proteínas para as análises seguintes. A distribuição de todas as proteínas identificadas entre os grupos de análise

demonstrou 281 proteínas em comum, sendo 30, 43 e 278 proteínas identificadas exclusivamente nos grupos controle, sepse e choque, respectivamente (Figura 5.11).

Tabela 5.6 – Números absolutos de espectros, peptídeos, e proteínas, obtidos após as análises no ambiente computacional PatternLab (FDR combinado inferior a 1%).

N=7	Controle	Sepse	Choque
PSM	227.095	222.461	298.045
Peptídeos Totais	7.989	12.760	15.884
Proteínas Totais	667	1.242	1.712
Proteínas Máx. Parcimônia	417	640	919
Proteínas com (no mínimo) 1 peptídeo proteotípico	384	570	792

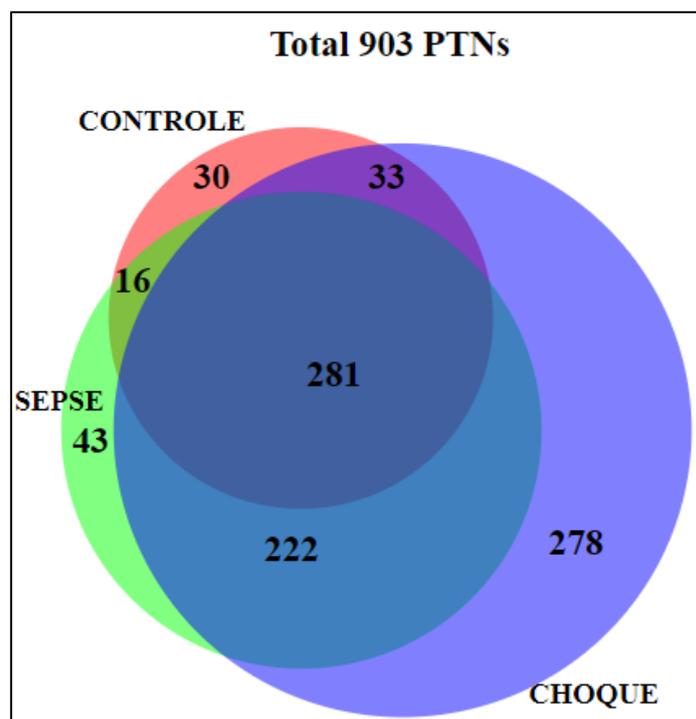


Figura 5.11 – Distribuição de todas as proteínas identificadas com confiabilidade estatística (FDR <1) entre os grupos de análise.

5.2.2. Proteoma Diferencial Identificado Entre os Grupos de Análise

A quantificação relativa das proteínas foi obtida utilizando-se uma metodologia sem marcação, baseada na contagem de espectros de MS/MS (SC do inglês: *spectral counting*). A distribuição das proteínas identificadas e quantificadas entre os grupos de análise, foi realizada primeiramente entre pacientes e controles, na condição da presença de uma proteína em pelo menos duas amostras por grupo. Com esses critérios, de um total de 765 proteínas distribuídas, 397 foram alocadas na intercessão entre os dois grupos, 356 proteínas foram alocadas como exclusivas do grupo pacientes e 12 exclusivas do grupo controle (Figura 5.12 A). Seguindo os mesmos critérios, na análise entre os grupos clínicos sepse e choque, de um total de 688 proteínas distribuídas, 560 foram alocadas na intercessão, 97 proteínas foram alocadas como exclusivas do grupo choque e 31 exclusivas no grupo sepse (Figura 5.12 B).

A estatística das diferenças de abundância das proteínas compartilhadas entre os grupos experimentais foi realizada no módulo *Tfold*. O número de proteínas diferencialmente abundantes nas comparações controles vs pacientes foram de 53 e 16 proteínas, respectivamente (Figura 5.13 A). Em sequência, 10 e 4 proteínas foram classificadas como diferencialmente abundantes entre sepse vs choque. (Figura 5.13 B).

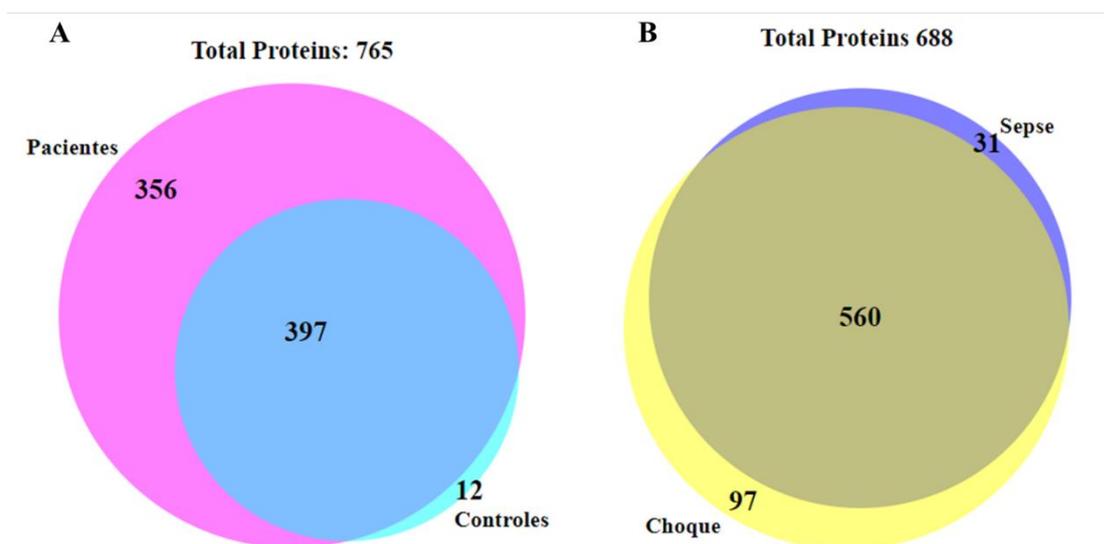


Figura 5.12 – Proteínas compartilhadas e exclusivas entre os grupos de análise. A) Comparando os grupos de pacientes e controles; B) comparando os grupos sepse e choque. Para uma proteína ser distribuída no Diagrama de Venn, esta deve estar presente em ao menos duas amostras por grupo.

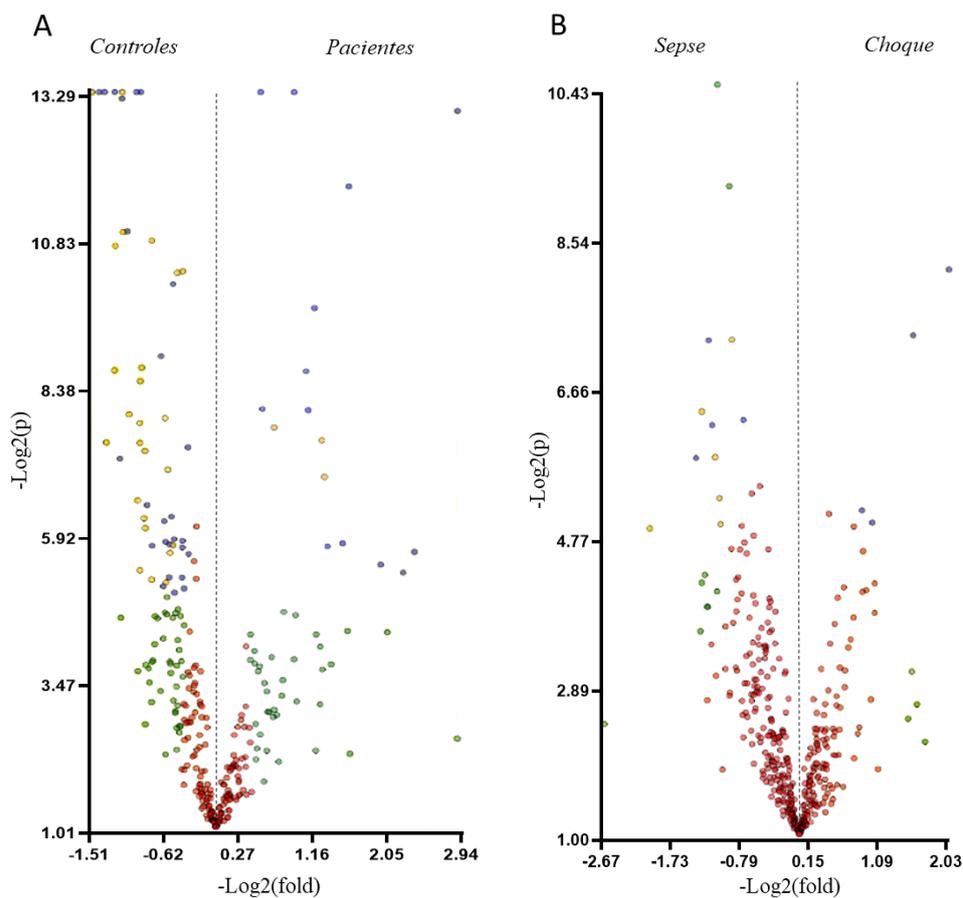


Figura 5.13 - Análise *T-fold* para determinação das diferenças de abundância entre as proteínas compartilhadas por A) amostras de pacientes e controles B) sepse e choque. Cada ponto representa uma proteína que é mapeada de acordo com o valor \log_2 de *fold change* e no eixo y e seu $-\log_2$ para o valor p do teste t. As proteínas de ponto azul satisfazem estatisticamente o valor de corte do *fold change* estabelecido. As proteínas amarelas também atendem ao limite de alteração de *fold change*, mas foram indicadas como estatisticamente diferentes. As proteínas do ponto verde atenderam ao ponto de corte de alteração de *fold change*, mas não podem ser anotadas como estatisticamente diferentes. Os pontos vermelhos não satisfizeram a alteração da dobra ou os cortes estatísticos.

Para avaliar a heterogeneidade das amostras nos diferentes grupos biológicos (controle, sepse e choque), o arquivo matriz contendo todas as proteínas identificadas e quantificadas, foi submetido a análise do grau de perturbação molecular (MDP) que representa numericamente o grau de alteração de um proteoma “teste” em relação ao grupo controle. O proteoma dos pacientes mostrou ser alterado, entretanto, não há distinção evidente entre os subgrupos sepse e choque (Figura 5.14), cuja diferença no proteoma está essencialmente concentrada em proteínas exclusivamente identificadas no grupo choque. Este padrão pode ser observado no *Heatmap*, ao analisar o perfil de

abundância relativa do proteoma identificado, entre os três grupos de análise (Figura 5.15).

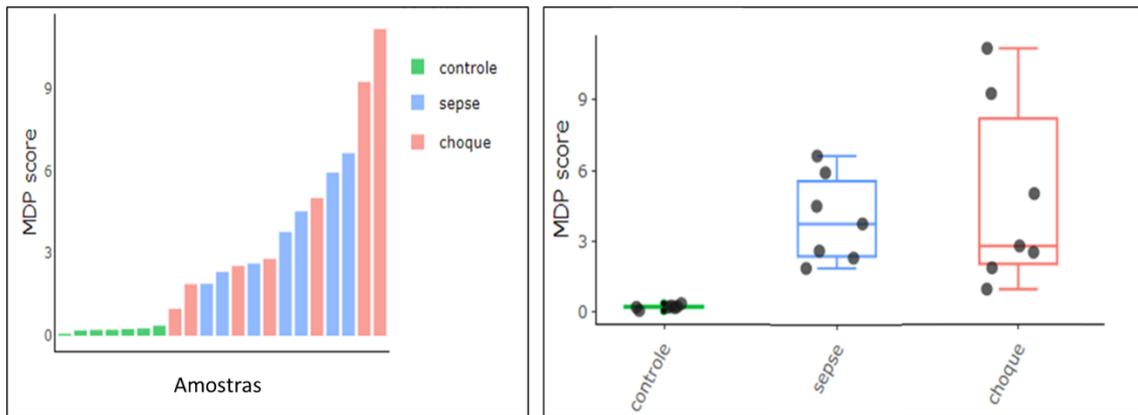


Figura 5.14 – Gráficos do Grau de Perturbação Molecular. O algoritmo pontua as amostras com base em sua perturbação quando comparadas às amostras Controles. A dispersão dos valores de expressão encontrados nas amostras de linha de base é usada para determinar se a expressão de uma amostra de caso único está dentro ou fora de dois desvios padrão da média das amostras do Controle. (A) histograma que representa os valores de cada indivíduo dos grupos em ordem crescente; (B) gráfico de pontos com valores individuais e a mediana e intervalo interquartil dos grupos.

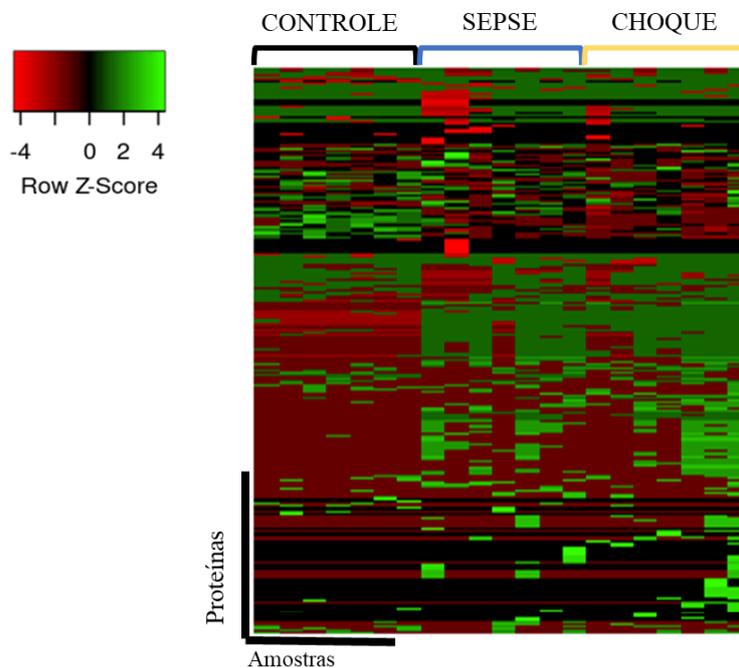
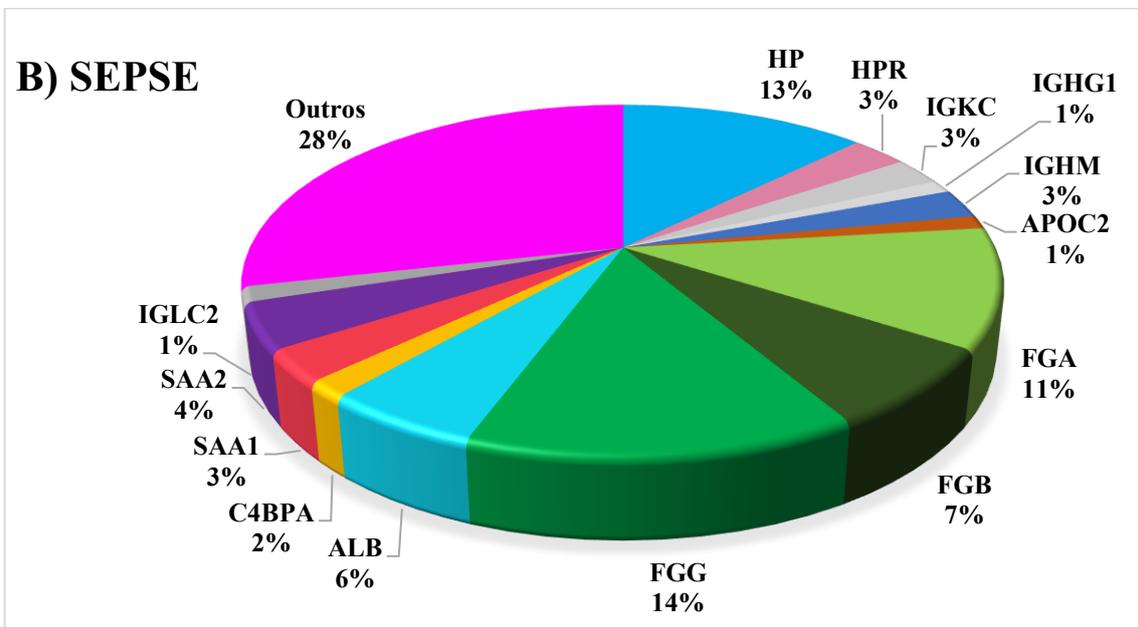
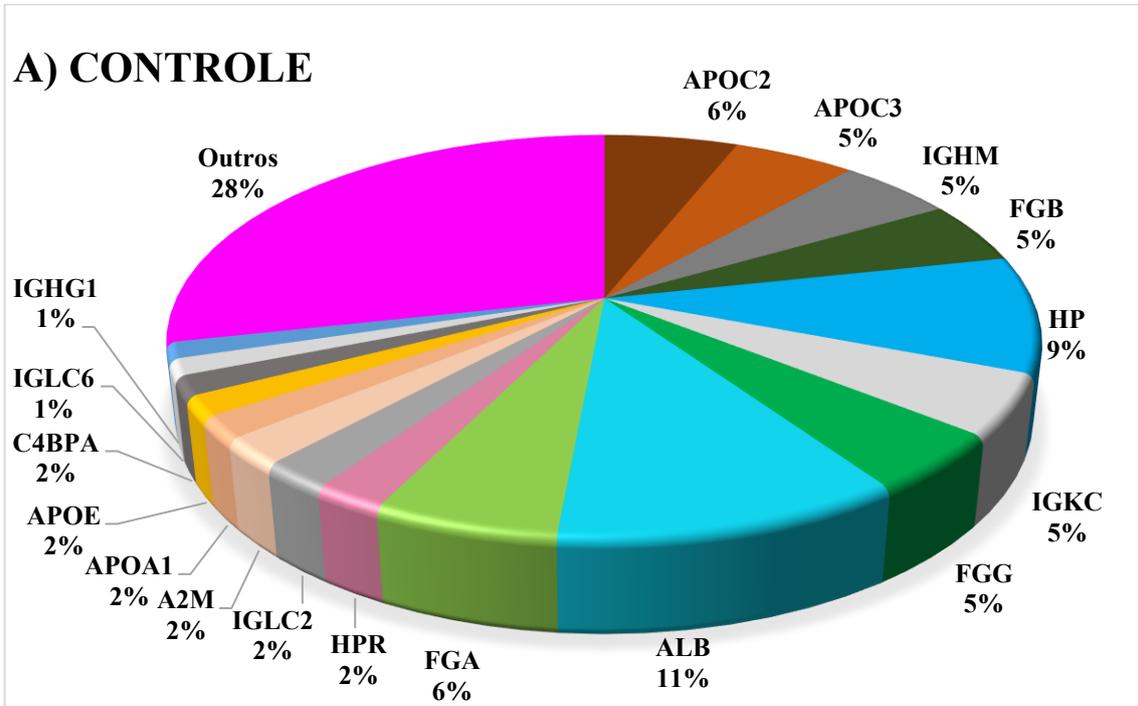


Figura 5.15 – *Heatmap* representativo das proteínas diferencialmente abundantes. Os valores de abundância são normalizados pelo z-score através da seguinte fórmula: $\text{abundância} - \text{valor médio} / \text{desvio padrão da abundância}$.

Adicionalmente, avaliamos a abundância global de todas as proteínas identificadas com pelo menos 1 peptídeo único, através dos valores de distribuição de espectros normalizado (NSAF). Esta análise é importante para determinar as proteínas de maior representatividade no proteoma e observar o intervalo dinâmico da abundância destas proteínas nas amostras (Figura 5.16 A, B e C).



C) CHOQUE

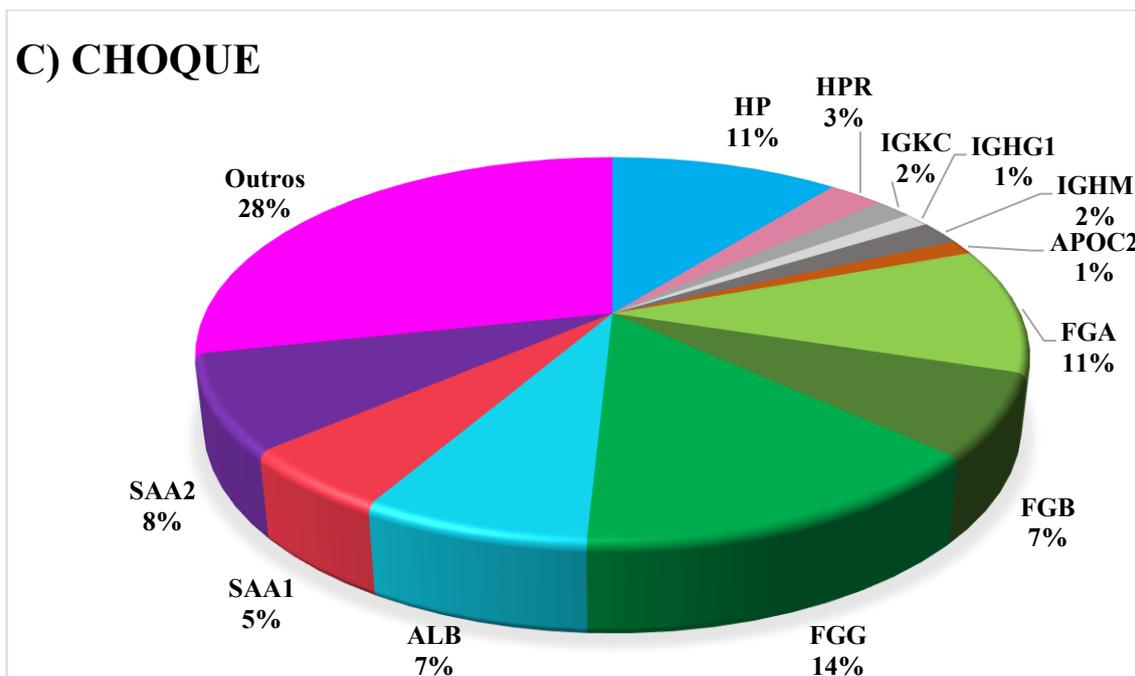


Figura 5.16 – Proteínas de maior abundância relativa no proteoma, segundo o valor de NSAF. Cadeias de Fibrinogênio (FG), Haptoglobina (HP), Proteína mieloide sérica, (SAA1 e SAA2) Albumina (ALB) e Apolipoproteína CII e CIII (APOC2 e APOC3) possuem os maiores valores nos proteomas identificados, com proporções diferentes ente os grupos de análise.

Controle: Albumina (ALB) 11%; Haptoglobina (HP) 9%; Cadeia Alfa do Fibrinogênio (FGA) 6%; Apolipoproteína C-II (APOC2) 6%; Cadeia Gama e cadeia Beta do Fibrinogênio (FGG e FGB) ambas com 5%; Apolipoproteína C-III (APOC3) 5%; Constante Kappa e Constante mu da cadeia pesada da imunoglobulina (IGKC e IGHM) ambas com 5%; Haptoglobina *related* (HPR) 2%; Constante 2 da cadeia lambda da imunoglobulina (IGLC2) 2%; Alfa 2 Macroglobulina (A2M) 2%; Apolipoproteínas AI e (APOA1 e APOE) ambas 1%; Cadeia Alfa da proteína de ligação C4b (C4BPA) 1%; Constante 6 da cadeia lambda da imunoglobulina (IGLC6) 1% e Constante 1 da cadeia Gama de imunoglobulina (IGHG1) 1%. Aproximadamente 28% do valor de distribuição de espectros restantes, estão distribuídos entre outras 360 proteínas que compõe o proteoma do grupo Controle.

Sepse: Cadeia Gama do Fibrinogênio (FGG) 14%; Haptoglobina (HP) 13%; Cadeia Alfa do Fibrinogênio (FGA) 11%; Cadeia Beta do Fibrinogênio (FGB) 7%; Albumina (ALB) 6%; Proteína amilóide sérica A I e A II (SAA1 e SAA2) 3% e 4% respectivamente; Haptoglobina *related* (HPR) 3%; Constante Kappa e Constante mu de cadeia pesada da imunoglobulina (IGKC e IGHM) ambas com 3%; Cadeia Alfa da proteína de ligação C4b (C4BPA) 2%; Apolipoproteína C-II (APO C2) 1%; Constante 2

da cadeia lambda da imunoglobulina (IGLC2) 1% e Constante 1 da cadeia Gama de imunoglobulina (IGHG1) 1%. Aproximadamente 28% do valor de distribuição de espectros restantes, estão distribuídos entre outras 550 proteínas que compõe o proteoma do grupo Seps.

Choque: Cadeia Gama do Fibrinogênio (FGG) 14%; Haptoglobina (HP) 11%; Cadeia Alfa do Fibrinogênio (FGA) 11%; Proteína amilóide sérica A I e A II (SAA1 e SAA2) 5% e 8%; Cadeia Beta do Fibrinogênio (FGB) 7%; Albumina (ALB) 7%; Haptoglobina *related* (HPR) 3%; Constante Kappa e Constante mu de cadeia pesada da imunoglobulina (IGKC e IGHM) ambas com 2%; Apolipoproteína C-II (APO C2) 1%; Constante 1 da cadeia Gama de imunoglobulina (IGHG1) 1%. Aproximadamente 28% do valor de distribuição de espectros restantes, estão distribuídos entre outras 770 proteínas que compõe o proteoma do grupo Choque.

Observamos que, mesmo com isolamento das VEs feito através da SEC, cujo desempenho foi superior aos demais métodos testados (Figura 5.4), um número pequeno de proteínas típicas do plasma possui uma representação expressiva no proteoma identificado, compreendendo aproximadamente 70% do valor de normalização da abundância de espectros (NSAF).

5.2.3 Componentes Celulares Enriquecidos no Proteoma de VEs.

Esta análise se refere à classificação de todas as proteínas identificadas em cada grupo biológico em relação aos “componentes celulares” descritos no banco de dados do Gene Ontology, usando o programa FunRich no módulo de Análise de enriquecimento. Devido a necessidade de conversão dos identificadores proteicos para os seus respectivos correspondentes gênicos (*gene name*), o número das proteínas identificadas diminuiu, essencialmente por causa das isoformas e identificadores não reconhecidos, de 384 para 229 no grupo controle; 570 para 428 no grupo seps; e de 792 para 634 no grupo choque.

Ao adicionar as listas de proteínas de cada grupo separadamente, e após selecionarmos a função de análise de termos classificados no *Gene Ontology* como de “componentes celulares”, os 10 principais termos enriquecidos com significância estatística (FDR) foram: componentes do núcleo e nucléolo; centróssomo; mitocondriais; espaço/região extracelular; citoesqueleto; membrana plasmática, lisossomo e exossomos. As diferenças entre os grupos de análise (controle x seps x choque) são mais acentuadas

no grupo controle, com menor porcentagem de representação nos termos de componentes do núcleo/nucléolo, centrossomo, mitocondriais, membrana plasmática, lisossomo e exossomos, possuindo uma representação mais elevada no termo de componentes da região extracelular e espaço extracelular. De modo geral, os grupos sepse e choque possuem representatividade semelhante (Figura. 5.17).

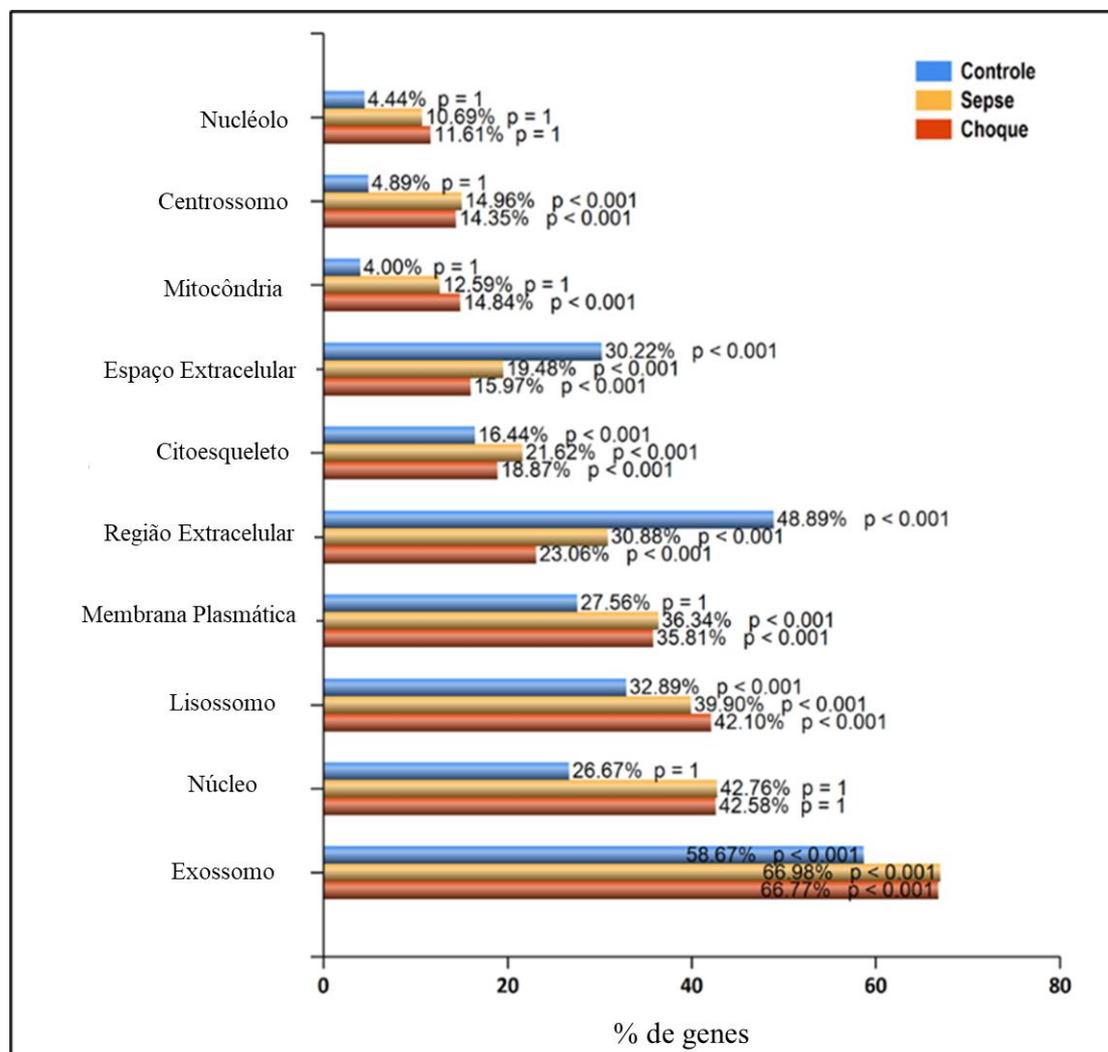


Figura 5.17 – Análise de enriquecimento das listas de proteínas dos grupos controle, sepse e choque, baseados no banco de dados do Gene Ontology usando o programa FunRich. No gráfico, o eixo y corresponde aos componentes celulares de maior significância estatística e no eixo x a quantidade proteínas associadas a estes termos, já convertidas para *gene name*.

Alternativamente, analisamos as proteínas identificadas nosso estudo com as proteínas anotadas no banco de dados Vesiclepedia. Este banco possui listas de proteínas e dados de VEs, identificados em mais de 1.254 estudos independentes. Para nossas comparações, selecionamos do banco somente as entradas provenientes de experimentos com VEs de plasma humano. Das 13.550 proteínas humanas contidas do banco, 1.485

proteínas (referentes a 320 experimentos) eram provenientes de trabalhos cuja análise foi realizada exclusivamente com VEs de plasma.

Quando comparamos todas as proteínas do grupos de análise (controle, sepse e choque) com as 1.485 proteínas selecionadas do banco Vesiclepedia, observamos que aproximadamente 70% ou 491 proteínas identificadas no nosso estudo estão anotadas neste banco. Logo, 211 proteínas ou aproximadamente 30% são exclusivas da nossa análise. Destas, o grupo choque foi o que obteve maior número de proteínas exclusivas (104). 156 proteínas foram identificadas em todas as listas. (Figura.5.18).

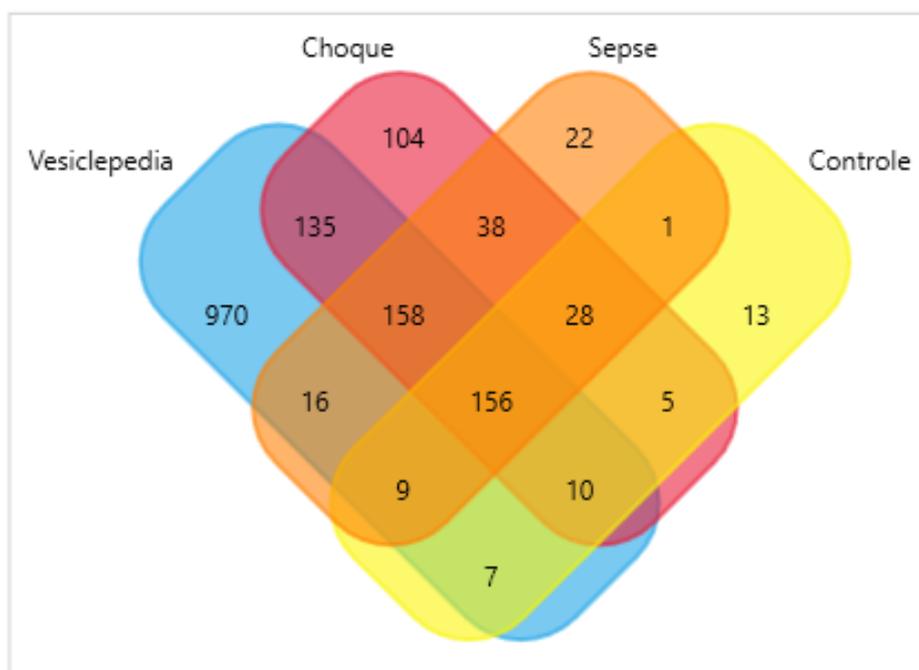


Figura 5.18 - Diagrama de Venn das comparações entre as proteínas do Vesiclepedia e as identificadas no proteoma de VEs (divididas entre os grupos biológicos controle, sepse e choque). O banco utilizado é composto por 1.461 proteínas identificadas em experimentos com VEs provenientes do plasma.

Proteínas da imunidade inata, essencialmente as que participam da via do complemento [C5, C8G, C4BPB, C3, C9, C6, C1RL, SERPING1, C1QB, CLU, C7, C8A, C4BPA, C8B, MBL2, C1QC, C1QA, CFI, MASP2, C1S, C4A, C4B, C1R], da coagulação sanguínea [SERPIND1, HRG, VWF, KLKB1, F13A1, KNG1, SERPING1, FGB, FGA, F2, PLG, GP1BA, FGG, F8, F13B, SERPINC1, F5, PROS1, SERPINA1], e da adesão celular [MYH9, VTN, LAMC1, THBS1, VWF, LGALS3BP, TNC, FERMT3, COL6A3, GP1BA, THBS4, CD9, SVEP1, RELN, CD36, ITGB3], bem como diversas proteínas componentes dos transportadores de lipídeos [LBP, APOC3, APOB, APOA1, APOE, APOL1, APOA2, APOM, APOF, PLTP, APOC1, APOC2, APOC4]

são algumas das principais proteínas da intercessão entre o banco de dados e os diferentes grupos de análise. Adicionalmente, as 970 proteínas representadas no Venn como exclusivas do banco de dados estão associadas a termos que não são observados no proteoma de nenhum grupo de análise, tais como, proteínas da reação oxirredutase, (exemplo: IDH3A, IFI30, TBXAS1, IDH1, GPX1, ALDH3A1, CYB5R2, MDH1, IDO2, HADH, HADHA, PDHB, G6PD) componentes celulares como de mitocôndria (exemplo: SLC25A11, SLC25A3, SLC25A5, SLC25A6, NDUFS3, NDUFA4, NDUFA5, NDUFB8, NOA1, NNT, ATP5O, ATP5J2, , ATP5C1, ATP5L, ATP5H, ATP5I) e proteínas envolvidas no processo de interação vírus-hospedeiro (exemplo: CD4, MAPK1, MSH6, ITGAV, BRD4, PSMB6, PSMB4, RAB6A, LAMP1, CAV1, UCKL1, FDPS, GYPA, NCKAP1, CD247, SRC, HLA-DRA, AP1M1, MAVS, VAPB, HTR2A, RAN, KRT8, WASF2, PSMB3), portanto, diferentes do conteúdo esperado para nossas amostras.

5.3 Vias Representadas Pelo Proteoma Diferencial dos Grupos de Análise.

Para identificar as vias bioquímicas estatisticamente super-representadas (*over-representation analysis*) pelas proteínas diferencialmente identificadas nos grupos controle, sepse e choque, utilizamos a ferramenta NetworkAnalyst 3.0, com a base de dados do Reactome. Como anteriormente descrito, comparamos os grupos biológicos da seguinte forma: controle *vs* pacientes (Pacientes = sepse + choque); e sepse *vs* choque. No item 5.2.2 são observados os resultados da análise quantitativa, usados para montagem das listas para as análises, as seguintes informações:

Tabela 5.7: Resultados da etapa de quantificação do proteoma de VEs dentre os grupos de análise.

	A) Total de proteínas	B) Exclusivas	C) Exclusivas	D) Diferencialmente abundantes - <i>up</i>	E) Diferencialmente abundantes - <i>down</i>
Controle x Pacientes	765	12 (controles)	365 (pacientes)	16 (pacientes <i>up</i>)	53 (pacientes <i>down</i>)
Sepse x Choque	688	31 (sepsis)	97(choque)	4 (choque <i>up</i>)	10 (choque <i>down</i>)

5.3.1 Pacientes vs Controles

Para estas análises geramos uma lista para cada grupo, contendo as proteínas alocadas exclusivamente, somado as proteínas classificadas como diferencialmente abundantes, (Tabela 5.7: pacientes = listas C+ D; controles = listas B+E). Somadas são 381 proteínas para pacientes e 65 dos controles. As vias/termos enriquecidos com maior significância estatística (Figura 5.19) e suas respectivas proteínas relacionadas ao grupo PACIENTES foram:

Ativação, sinalização e agregação plaquetária; ACTN4, ACTN1, ALDOA, APP, RHOA, CALM1, CD36, CDC42, CFL1, F8, FCER1G, FGA, FGB, FYN, GNAI2, GNAI3, GNB1, GNB2, LYN, CD31, PFN1, PLEK, CXCL7, PPIA, SRGN, RAC1, RAC2, RAP1B, SELP, SOD1, SPARC, TGFB1, TLN1, TUBA4A, VCL, WDR1, CAP1, MMRN1, GNB4, incluindo as proteínas associadas ao complexo GP1b-IX-V [FLNA, GP1BA, GP1BB, GP5, GP9, VWF e YWHAZ] em conjunto com elementos coagulação: F10, F8 e F9.

Sistema Imune Inato; composto essencialmente por proteínas do processo de degranulação de neutrófilos, ADAM10, ALDOA, ANPEP, ARPC5, BIN2, CAP1, CAPN1, CD36, CD44, CD53, CD59, CPNE3, CTSG, EEF1A1, FCER1G, GSTP1, HLA-B, HPSE, HSP90AA1, HSP90AB1, HSPA1A, HSPA8, LYZ, MME, MMP9, MPO, PECAM1, PKM, PNP, CXCL7, PRSS2, PRSS3, PTPRC, RAB10, RAC1, RAP1B, RETN, RHOA, STOM, VCP e sistema componentes do sistema complemento: C9, CD59, CFHR5, CRP e VTN.

Comunicação célula-célula e interações entre superfície com a parede vascular; ACTN4, ACTN1, FLNA, FYN, RAC1, ITGA6/ITGB1, JAM-A, VASP, FLNC, ILK,

RSU1, PARVB, SFTPD, CLDN5, FCER1G, LYN, PECAM1, PPIA, SELP, BSG, ITGB2, KRAS, SPN. Proteínas envolvidas na organização e na interação de células com a matriz extracelular; ACTN1, ADAM10, APP, BSG, CAPN1, CD44, COL18A1, COL3A1, COL4A2, CTSG, EMILIN2, JAM-A, FBLN2, FBN1, FGA, FGB, HSPG2, ICAM1, ICAM2, ITGA6/ITGB1, ITGB2, LAMA2, LAMB1, LAMC1, LTBP1, MMP9, NID1, P4HB, CD31, PPIB, PRSS2, SDC1, SPARC, TGFB1, TNC, VCAM1, VCAN, VTN, VWF.

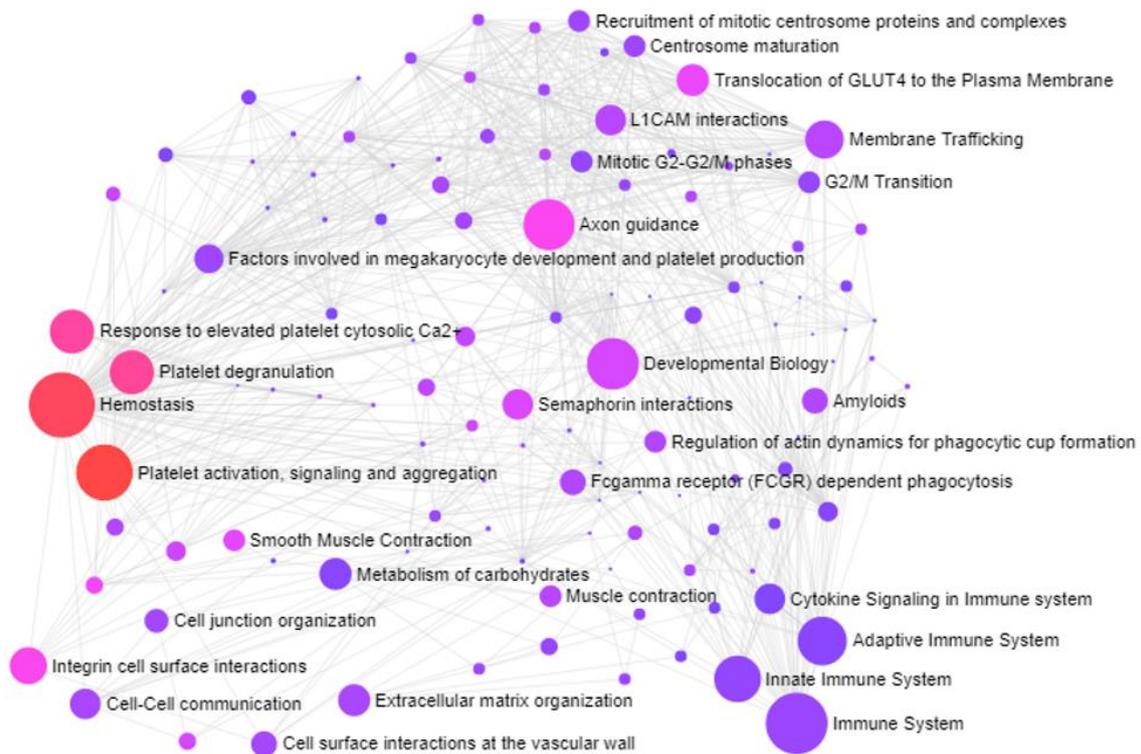


Figura 5.19 - Mapa de enriquecimento de vias das proteínas exclusivas (C na tabela 5.7) e diferencialmente abundantes (*up* ou D na tabela 5.7) dos pacientes (sepsis + choque). Os termos organizados em grafos possuem sua representatividade indicada pela cor mais intensa nos termos de maior valor estatístico (FDR > 0.01).

De maneira complementar e bem menos complexo, as vias/termos enriquecidos com maior significância estatística (Figura. 5.20) e suas respectivas proteínas relacionadas ao grupo Controle foram:

Sistema complemento (ativação, via clássica e via lectina; regulação negativa): C1QC; C4BPB; CFH; CFP e MASP1.

Coagulação e fibrinólise (formação: KLKB1, F13B, A2M; dissolução: HRG; SERPINF2). E outros componentes também envolvidos na ativação plaquetária: HRG; APOA1; ITIH4; CLEC3B; SERPINF2; A2M; ECM1; SERPINA4.

Lipoproteínas: APOA1; APOC3; APOA4 e A2M.



Figura 5.20 - Mapa de enriquecimento de vias das proteínas exclusivas (B na tabela 5.7) e diferencialmente abundantes (*up* ou E na tabela 5.7) do grupo Controle. Os termos organizados em grafos possuem sua representatividade indicada pela cor mais intensa nos termos de maior valor estatístico (FDR > 0.01).

5.3.2 Sepsis vs Choque

Para estas análises geramos uma lista para cada grupo, contendo as proteínas alocadas exclusivamente, somado as proteínas classificadas como diferencialmente abundantes, (Tabela 5.7: Sepsis = listas B+E e Choque = listas C+D). Somadas são 41 proteínas para o grupo sepsis e 101 para a lista do grupo choque.

As vias/termos enriquecidos com maior significância estatística (Figura 5.21) e suas respectivas proteínas relacionadas do grupo sepsis foram:

Homeostase; CLU, FLNA, SELP, SOD1, SPARC, TUBB4A. De modo mais pontual, foram observadas proteínas que participam da Organização da Dinâmica do citoesqueleto; CORO1C, TUBB4A, SOD1, ARPC5, FLNA, ACTR3.

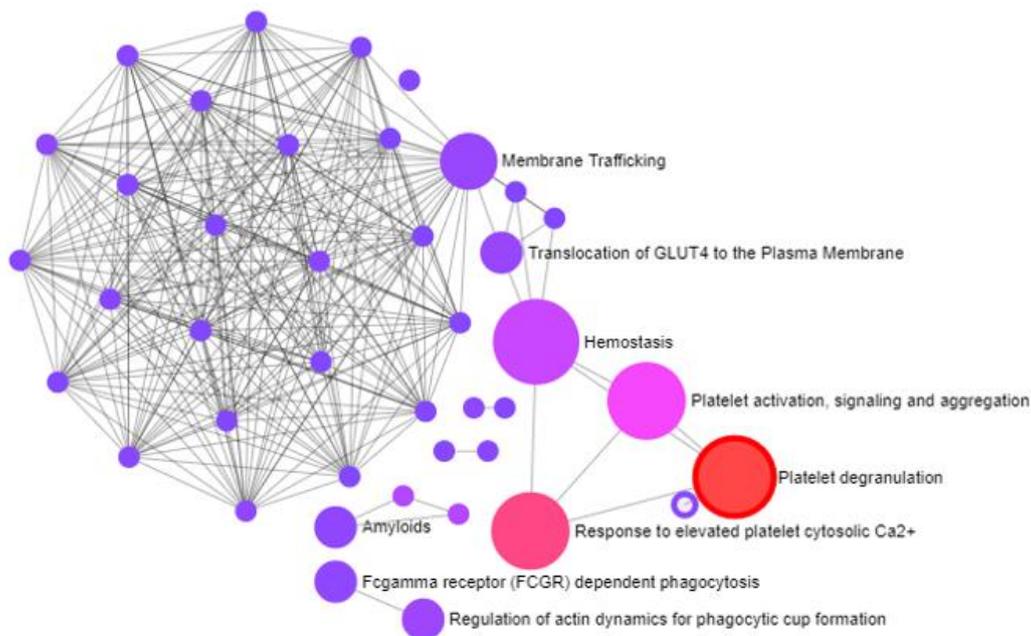


Figura 5.21 - Mapa de enriquecimento de vias das proteínas exclusivas (B na tabela 5.7) e diferencialmente abundantes (*up* ou E na tabela 5.7) do grupo Seps. Os termos organizados em grafos possuem sua representatividade indicada pela cor mais intensa nos termos de maior valor estatístico (FDR > 0.01).

As vias/termos enriquecidos com maior significância estatística (Figura 5.22) e suas respectivas proteínas relacionadas do grupo choque foram:

Sistema imune inato: ACTR2, CALML5, CD14, CD44, CD53, CPNE3, CTSG, DSP, EEF1A1, FLG2, FTL, GDI2, GPI, HSP90AB1, LCN2, MPO, OLFM4, PNP, PRSS2, PTPRC, RAB7A, RETN, SDCBP e SERPINB1.

Sinalização celular via citocinas e interleucinas: ANXA1, LCP1, SOD2, CAPZA1, FYN, LCN2, CDC42, LYN, ICAM1, CD44 e IFITM3.

Interações da organização extracelular: BSG, CD44, COL18A1, COL3A1, COL4A2, COL6A1, F11R, HSPG2, ICAM1, LAMA2, PRSS2, e Interações Celulares: CD99, CD44, BSG, FYN, F11R, SPN, LYN.

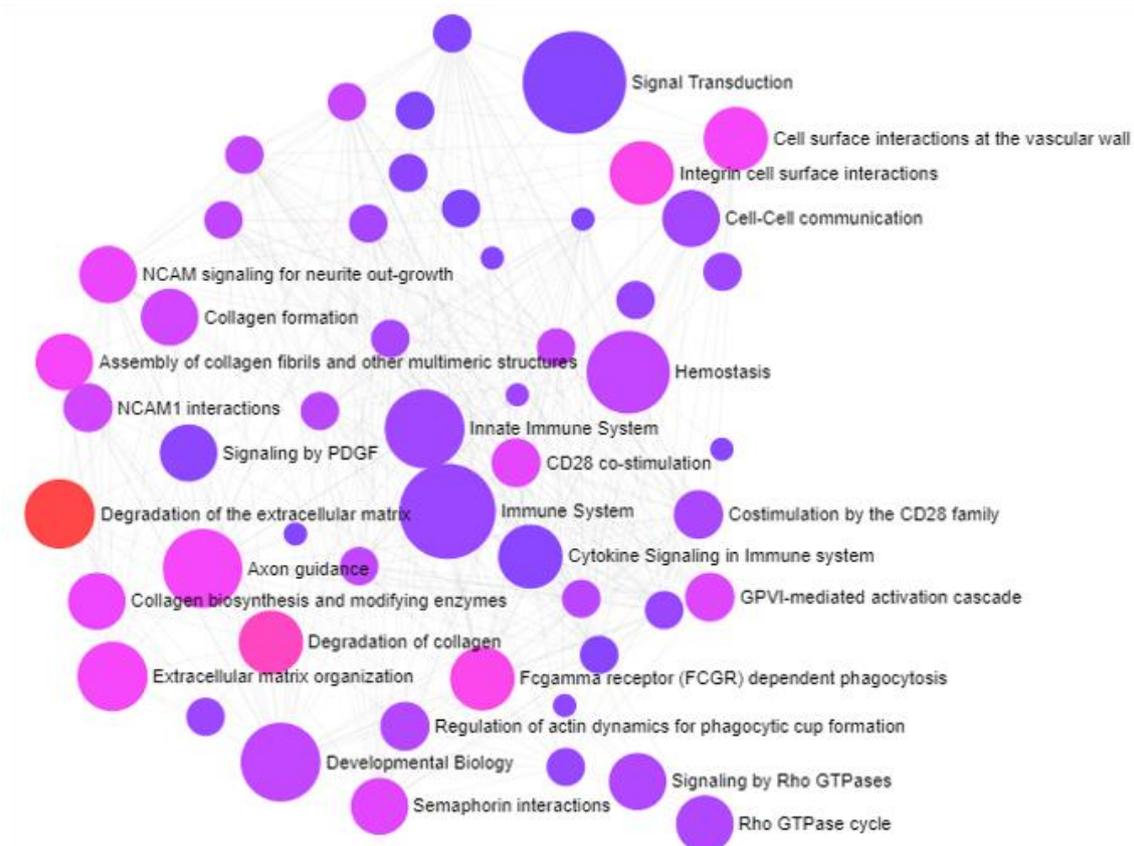


Figura 5.22- Mapa de enriquecimento de vias das proteínas exclusivas (C na tabela 5.7) e diferencialmente abundantes (*up* ou D na tabela 5.7) do grupo Choque. Os termos organizados em grafos possuem sua representatividade indicada pela cor mais intensa nos termos de maior valor estatístico (FDR > 0.01).

5.4 Rede de Interação do Proteoma Diferencial Identificado nas VEs de Pacientes.

A fim de avaliar o grau interação e de intermediação das proteínas identificadas nas VEs do grupo de pacientes, foi construída uma rede de interação proteína-proteína, com auxílio do programa NetworkAnalyst. Este programa monta uma rede de interações com base no *input* (proteoma identificado), adicionando proteínas diretamente relacionadas, com interações validadas em um escore de confiabilidade de 900 (em uma escala de 0 a 1000) da base de dados do String Interactome. O proteoma diferencial do grupo pacientes composto por 381 entradas proteicas gerou uma rede de 2.217 nós e 4.666 interações. Os maiores *Seeds* correspondem aos nós com grau de interação mais significativos (Figura. 5.23) são esses: UBA52; HSP90AA1; RAC1; RHOA; CDC42; FYN; UBC; HSP90AB1; GNAI3; HSPA8; LYN; RAC2; YWHAZ; YWHAE; APP; YWHAB; H2AFX; EEF1A1; YWHAG. cujas descrições podem ser resumidamente

observadas na Tabela 5.8. O proteoma referente aos demais grupos de análise não possuem entradas suficientes para compor uma rede com escore de confiabilidade adequado.

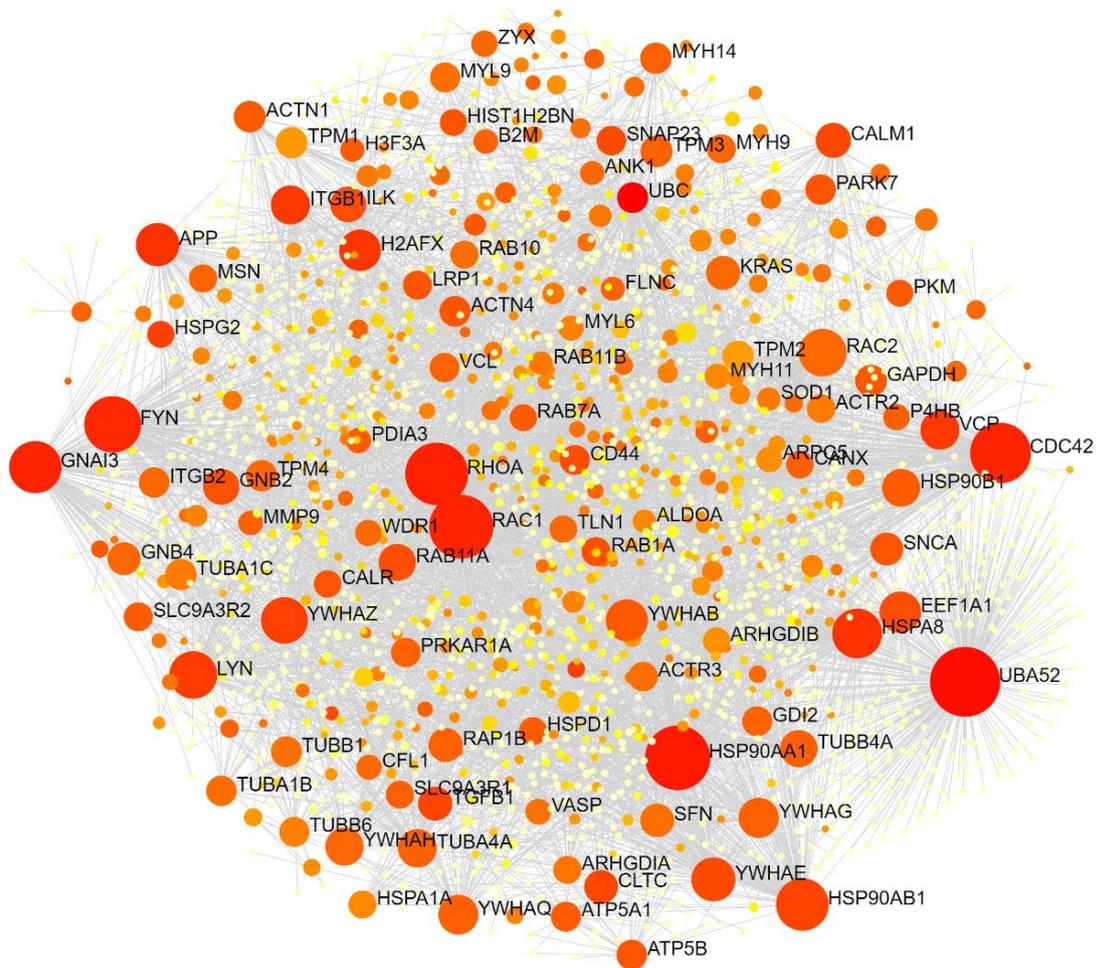


Figura 5.23 – Rede de interação proteína-proteína com as identificações relativas ao grupo de amostras clínicas. As interações são feitas pela base de dados do string interactome com escore de evidencias clínica em 900. Os nós mais relevantes (seeds) são destacados por tamanho e coloração mais intensa.

Tabela 5.8 – Relação dos principais nós (proteínas) da rede de P.P.I. do grupo pacientes, o valor da interação e a descrição resumida das proteínas.

Principais proteínas da rede PPI (Pacientes)	Score	Descrição	Distribuição da proteína no grupo Pacientes
UBA52	306	Proteína ribossômica L40 Ubiquitina-60S: Constituinte estrutural do ribossomo.	Em 5 amostras do grupo Pacientes.
HSP90AA1	238	Proteína <i>Heat shock</i> HSP 90-alpha: Proteína chaperona; atua na ativação de células imunes. Recentemente foi observado como alvo do miR-1 no modelo de lesão em isquemia/reperfusão.	Em 7 amostras do grupo Pacientes.
RAC1	226	GTPase Rac1: Transdutor de sinal que regula vários processos relacionados a reações inflamatórias, como adesão celular, quimiotaxia, permeabilidade vascular e reorganização do citoesqueleto.	Em 10 amostras do grupo Pacientes.
RhoA	212	Pequena GTPase: Principalmente associado à organização do citoesqueleto.	Em 6 amostras do grupo Pacientes.
CDC42	190	Homólogo de proteína de controle de divisão celular 42: Pequena GTPase associada à membrana plasmática que circula entre um estado ligado ao GTP ativo e um estado ligado ao GDP inativo. No estado ativo, liga-se a uma variedade de proteínas efetoras para regular as respostas celulares.	Em 4 amostras do grupo Pacientes.
FYN	154	Proteína Tirosina quinase Fyn. desempenha um papel em muitos processos biológicos, incluindo regulação do crescimento e sobrevivência celular, adesão celular, sinalização mediada por integrina, remodelação do citoesqueleto, motilidade celular, resposta imune	Em 3 amostras do grupo Pacientes.
HSP90B1	121	Proteína Heat shock HSP 90 beta1 (endoplasmína): Em contraste com outras chaperonas, a endoplasmína é seletiva, menos de 20 proteínas alvo parecem exigir a endoplasmína para dobramento, como os receptores Toll-like e integrinas, sendo assim	Em 7 amostras do grupo Pacientes.

		associada a uma chaperona importante na regulação da imunidade inata e adaptativa.	
GNAI3	119	Proteína G (i) de ligação ao nucleotídeo da guanina subunidade alfa-3. As proteínas heterotriméricas de ligação ao nucleotídeo guanina (proteínas G) funcionam como transdutores a jusante dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) em numerosas cascatas de sinalização.	Em 4 amostras do grupo Pacientes.
HSPA8	103	Proteína Heat shock 71 kDa: Envolvida na apresentação de peptídeos antigênicos via MHC II para células T CD4. Ação de ATPase na desmontagem de vesículas revestidas de clatrina no transporte de componentes da membrana nas células; e desempenha um papel fundamental na autofagia.	Em 12 amostras do grupo Pacientes.
LYN	91	Tirosina-proteína quinase Lyn: Da família de tirosina quinases citoplasmáticas (Src); transmite sinais de receptores de superfície e desempenha um papel importante na regulação de mecanismos envolvidos na respostas imune como hematopoiese, respostas a fatores de crescimento e citocinas, sinalização de integrina, como também na respostas a danos ao DNA e agentes genotóxicos. Funciona como regulador negativo, ou ativador, dependendo do contexto molecular.	Em 4 amostras do grupo Pacientes.
RAC2	91	GTPase Rac2: Regulador chave na modulação da funcionalidade dos neutrófilos por ROS e NO, tendo envolvimento já reportado na geração de NETs.	Em 10 amostras do grupo Pacientes.
YWHAZ	85	14-3-3 proteína zeta: Da família de proteínas 14-3-3 que modulam a transdução de sinal por meio da fosforilação de motivos serina / treonina de proteínas-alvo. Particularmente a YWHAZ atua na regulação da sobrevivência celular	Em 14 amostras do grupo Pacientes.

interagindo com muitas proteínas apoptóticas.

YWHAE	72	14-3-3 proteína épsilon: Recentemente relatado que 14-3-3 ϵ pode coordenar suas interações dinâmicas com TAK1 e PPM1B para modular diferencialmente as mudanças induzidas por TNF- α na atividade de NF- κ B// Adicionalmente, foi demonstrado que a ligação de PPAR ao gene 14-3-3 ϵ e subsequente expressão 14-3-3 desencadeou efeitos antiapoptóticos em células endoteliais humanas.	Em 12 amostras do grupo Pacientes.
APP	69	Proteína precursora de beta amilóide. Implicada em uma série de funções fisiológicas, inclusive na regulação da formação das sinapses	Em 2 amostras do grupo Pacientes.
YWHAB	63	14-3-3 proteína beta: Recentemente relatado uma possível influência na gliconeogênese hepática, uma vez que aumenta a expressão de PEPCK e G6Pase por ligação ao DNA no promotor PEPCK.	Em 11 amostras do grupo Pacientes.
H2AFX	61	Histona H2AX. Variante que substitui H2A convencional em um subconjunto de nucleossomos.	Em 4 amostras do grupo Pacientes.
EEF1A1	60	Fator de alongamento 1-alfa 1. Promove a ligação dependente de GTP do aminoacil-tRNA ao sítio A dos ribossomos durante a síntese de proteínas. Desempenha um papel na regulação positiva da transcrição de IFNG em células T auxiliares	Em 2 amostras do grupo Pacientes.
YWHAG	55	Proteína 14-3-3 gama: Recentemente observada em autoexpressão em artérias lesadas e células de músculo liso vascular humano, estimuladas por fator de crescimento e citocinas.	Em 10 amostras do grupo Pacientes.
YWHAQ	54	Proteína 14-3-3 teta: Recentemente foi observado que as ligações dessa isoforma com proteínas do ciclo celular é aumentada em modelo de infecção.	Em 9 amostras do grupo Pacientes.

5.5 Mapeamento das Proteínas Envolvidas na Ativação Plaquetária e Degranulação de Neutrófilos.

Algumas proteínas associadas a processos de grande interesse para o contexto biológico, como ativação plaquetária e degranulação de neutrófilos, segundo a análise de enriquecimento, foram usadas na construção de um *heatmap* para uma sub-análise. De modo geral, estes processos tiveram maior representatividade no proteoma das amostras de pacientes (Figura 5.24) destacando os seguintes grupos:

Glicoproteínas do complexo GP1B-IX-V, que estão envolvidas na adesão inicial de plaquetas a componentes subendoteliais, expostos após injúria, como o Fator de Von Wilerbrand, colágeno e laminina (127,128). Proteínas de ligação a actina identificadas como Profilina-1, Filamina-A e C, Cofilina e VASP compoendo um grupo de moléculas importantes na regulação da dinâmica do citoesqueleto, em conjunto com as pequenas GTPases como RAC1, RAC2, RAP1B e CDC42 (129), sendo a reorganização do citoesqueleto um processo fundamental para as alterações morfológicas de plaquetas, decorrente das ligações com componentes subendoteliais, por exemplo (130). Proteínas associadas a ativação e degranulação de neutrófilos como Olfactomedin 4, Mieloperoxidase, Catepsina G e Lisozima C, que interessantemente estão presentes de forma mais acentuada em amostras do grupo choque séptico, sendo fundamentais para eliminação de patógenos. Em contrapartida, a disseminação e o aumento dos níveis intravasculares dessas proteínas, podem induzir aumento da proteólise, lesão endotelial e falência de órgãos (131). Em um ensaio clínico recente com pacientes cirúrgicos, pesquisadores observaram que um painel de marcadores da degranulação de neutrófilos como um indicador para choque séptico (132).

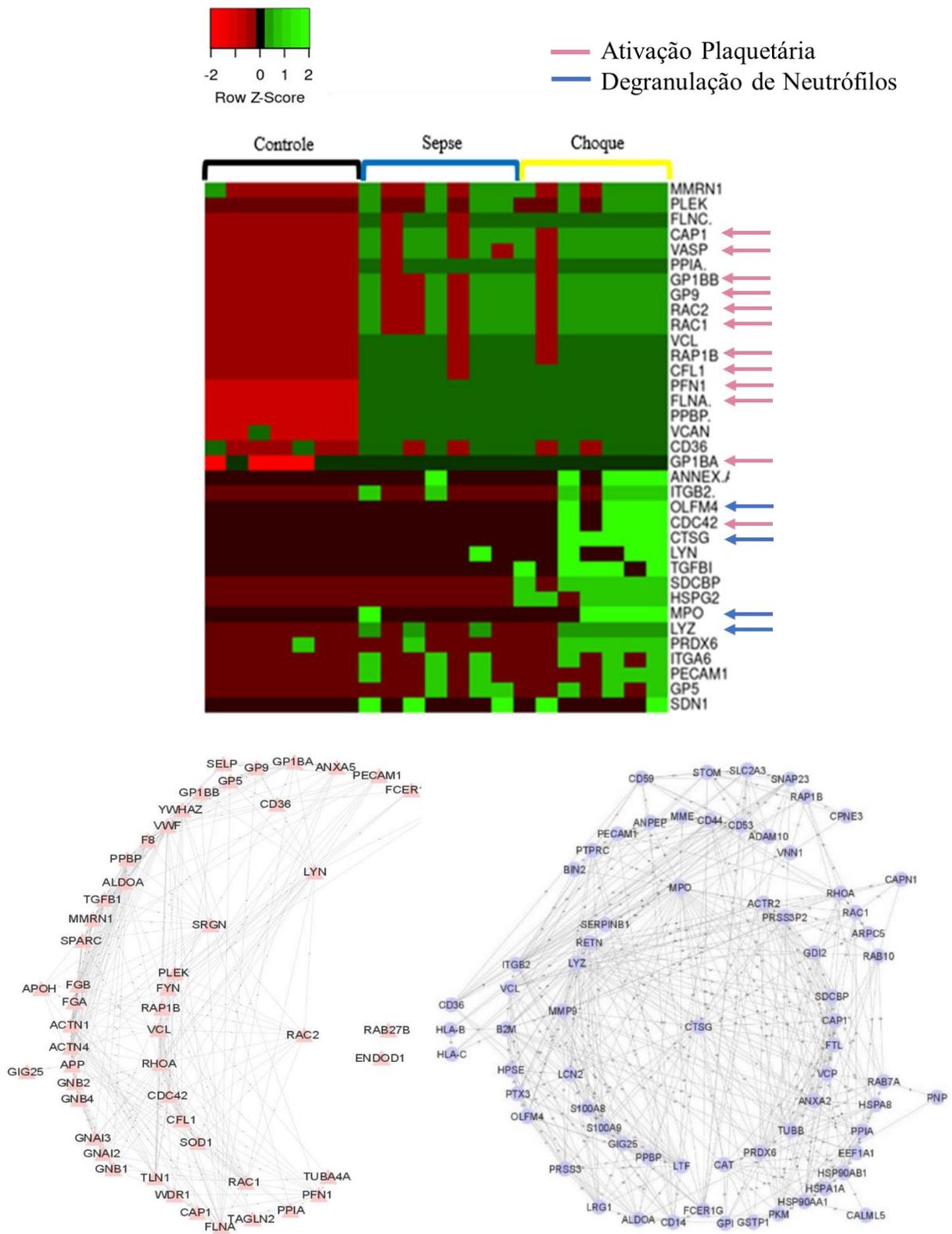


Figura 5.24 - Proteínas associadas a ativação plaquetária e degranulação de neutrófilos, entre os grupos de análise. Os valores de abundância relativa foram normalizados pelo z-score e dispostos em um mapa de calor, feito com auxílio da ferramenta Heatmapper. As proteínas destacadas podem ser observadas nas redes de PPI entre as proteínas do processo de Ativação plaquetária (rosa) e Degranulação de Neutrófilos (azul). Os nós que representam suas respectivas proteínas (símbolos gênicos) estão dispostos em layout radial.

6. Discussão

Nesse estudo, o proteoma de VEs isoladas do plasma de pacientes com sepse e choque séptico, foi avaliado qualitativa e quantitativamente, comparado ao proteoma das VEs de doadores saudáveis. Ambas as áreas de pesquisa, sepse e VEs plasmáticas, apresentam desafios que podem impactar diretamente nos resultados, como abordado na revisão de Reaven e colaboradores (59). Nesta revisão, os autores destacam a diversidade de métodos de isolamento/enriquecimento de VEs, e as divergências entre grupos de pesquisa quanto à seleção adequada da coorte para o estudo de VEs.

Os métodos de isolamento de VEs podem variar e dependem essencialmente da amostra a ser estudada. No caso do plasma, os protocolos mais frequentes são: isolamento por ultracentrifugação; por centrifugação seriada ou diferencial; por esferas de imunoafinidade, e por cromatografia de exclusão molecular (133). Alguns trabalhos comparam estes protocolos de isolamento (134–136) e descrevem que, atualmente todos os métodos disponíveis apresentam prós e contras, que devem ser analisados de acordo com o objetivo principal de cada estudo:

Métodos de centrifugação seriada ou ultracentrifugação, se baseiam na separação sequencial de partículas por sedimentação, dependente de tamanho e densidade, e usando forças centrífugas (usualmente 10.000 e 100.000 x g) em determinado tempo (102,137). São relativamente simples quanto à disponibilidade de materiais, sendo a centrífuga ou ultracentrífuga os únicos equipamentos requeridos. Entretanto, proteínas não relacionadas às VEs e lipoproteínas, tendem a co-precipitar com as VEs (102). Estes métodos também podem alterar a morfologia das VEs (138), prejudicando análises funcionais ou mesmo análises de quantificação e caracterização de tamanho, que dependem da integridade destas estruturas.

Esferas de imunoafinidade geralmente são usadas para melhorar a especificidade, como um método complementar ou independente, enriquecendo um subgrupo célula-dependente de VEs. Sua principal desvantagem é a dependência de marcadores/anticorpos específicos e o custo dos kits de isolamento (136). Adicionalmente, a remoção dos marcadores durante o experimento também pode alterar a morfologia das VEs (139).

A cromatografia de exclusão molecular tem sido usada para isolamento de VEs por ser um método simples, rápido, que não depende de equipamentos complexos e que preserva a estrutura das VEs (133,140). Entretanto, é descrito que, assim como em

métodos baseados em sedimentação, as VEs são co-isoladas com lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade (44).

Independentemente do método de isolamento escolhido, para fins de análise por espectrometria de massas, a separação das VEs do plasma deve ser necessariamente eficiente (141–143). Nesse projeto, o primeiro desafio enfrentado foi a escolha de um método de isolamento de VEs do plasma, que fosse compatível com a análise proteômica, pois não há consenso na literatura sobre a eficiência dos métodos disponíveis. Tal necessidade ocorre pela interferência de proteínas abundantes do plasma, na análise proteômica das proteínas menos abundantes, contidas nas VEs. A concentração de proteínas no plasma varia em mais de 10 ordens de magnitude (10 à 10^{11} pg/mL) (96), dificultando a identificação das proteínas menos abundantes. Por essa característica do proteoma do plasma e devido à natureza de análise por espectrometria de massas, especialmente quando a aquisição é dependente do dado (DDA), as proteínas mais abundantes tendem a ser favorecidas na identificação (144).

Tendo estas questões levantadas, nosso primeiro experimento foi o isolamento de VEs do plasma por Centrifugação Seriada (CS). Em um experimento-piloto, VEs isoladas por CS em 1 mL de plasma, foram submetidas a análise proteômica. Nesse resultado, foi observado que 25% dos espectros associados a identificação (PSMs) foram referentes à albumina (17.053 de 68.066 espectros, Tabela 5.2). Além disso, ApoB100 foi a apolipoproteína com mais identificações (1.641 de 2767 espectros associados a apolipoproteínas). Somando-se albumina e todas as apolipoproteínas, 29,11% das identificações se referiram à estas moléculas.

Alternativamente, a eficiência do isolamento de VEs por SEC também foi testada. Os resultados demonstraram que, na cromatografia, as VEs são eluídas entre as frações 6 e 14, corroborando com a literatura (Figura 5.1) (124). Adicionalmente, foi observado que há uma sobreposição entre a eluição das VEs e das proteínas plasmáticas, essencialmente a partir da fração 11 (Figura 5.1). Para avaliar quais frações estavam enriquecidas com VEs e continham a menor “contaminação” com proteínas plasmáticas, analisamos por espectrometria de massas, as frações de 1 a 5 em conjunto e de 6 a 14 individualmente, onde observamos que os espectros referentes a albumina chegam a triplicar entre a fração 11 e a fração 12. Adicionalmente, uma quantidade expressiva de espectros referentes a apolipoproteínas também foram observados entre as frações de 6 a 11, enriquecidas com VEs (Figura 5.3).

Com base nesses resultados, foi decidido testar a eficiência dos métodos de isolamento de VEs plasmáticas, por CS ou SEC, para posterior análise proteômica. Para tal, foram utilizadas 4 amostras de plasma de doadores saudáveis e testamos o desempenho da CS e da SEC, com e sem a adição de uma etapa de separação de LDL por ultracentrifugação com gradiente de densidade bifásico (UG) na tentativa de retirar as lipoproteínas e aumentar as identificações de proteínas de VEs por espectrometria de massas.

Na análise proteômica das VEs isoladas por esses 4 métodos, foi observado que, apesar da eficiência de UG na redução dos espectros referentes a apolipoproteínas (redução de 2,9% para 1,9% por CS e redução de 8,8% para 2,1% por SEC) os espectros referentes a albumina aumentaram em ambos os métodos (27% para 54,9% por CS e 19,9% para 32,2% por SEC). Adicionalmente, ao analisar as proteínas identificadas com o banco de dados Vesiclepedia, foi observado que o proteoma de VEs isoladas por SEC, obteve maior sobreposição com o banco, com ou sem aplicação de UG (105 proteínas em SEC+UG e 103 proteínas em SEC), comparado com o proteoma de VEs isoladas por CS (86 proteínas em CS+UG e 83 proteínas em CS).

É importante ressaltar, que o banco Vesiclepedia é alimentado por dados obtidos através de diversos trabalhos, que investigam moléculas de VEs em diferentes contextos biológicos. Esses dados carecem de validações complementares, que auxiliem na confiabilidade em afirmar que as moléculas encontradas são provenientes de VEs especificamente, ou se esse conjunto de dados podem conter, por exemplo, proteínas do plasma. Porém, é uma ferramenta necessária, que auxilia na avaliação das principais moléculas frequentemente encontradas nos estudos que exploram o conteúdo de VEs. Por último, avaliando o tempo e o labor necessário em cada protocolo, concluímos que a adição do passo de UG não atendeu aos objetivos esperados.

Avaliando especificamente os resultados do proteoma das VEs isoladas por CS e por SEC, foi observado que a SEC apresentou melhor rendimento em números de identificação de peptídeos e proteínas (Tabela 5.4) Adicionalmente, a identificação de espectros associados a albumina foi superior no proteoma de VEs isoladas por CS (38.970 espectros associados a albumina, obtidos por CS e 30.388 espectros obtidos por SEC), enquanto os espectros associados as apolipoproteínas foram identificados em maior quantidade, no proteoma de VEs isoladas por SEC (4.231 associados a apolipoproteínas, obtidos por CS e 13.526 espectros obtidos por SEC). Somando os espectros associados a albumina e apolipoproteínas, ambos os métodos possuem cerca de 30% dos seus espectros

identificados, associados a esses potenciais “contaminantes”. Vale ressaltar que ainda são necessários testes complementares, voltados para averiguação da presença e da real proporção de proteínas comuns no plasma nas VEs. Assim, tendo em consideração os parâmetros: tempo de processamento; número de peptídeos identificados; número de proteínas inferidas; percentagem de espectros associados a albumina/apolipoproteínas; e intercessão com proteínas anotadas nos bancos de dados de VEs (Figura 5.4), escolhemos SEC como o método de isolamento mais apropriado para identificação do proteoma de VEs do plasma das amostras experimentais.

Outro aspecto importante em estudos que abordam amostras clínicas de condições complexas como a sepse, são os critérios de seleção da coorte de interesse. Reaven e colaboradores (59) comentam as dificuldades inerentes a natureza extremamente heterogênea desses pacientes, como exemplo, os possíveis sítios de infecção, agentes etiológicos, comorbidades pré-existentes e fatores demográficos. Os estudos realizados com coortes heterogêneas de sepse, refletem a realidade clínica, e os resultados dessas observações podem ser associados a uma população-alvo mais ampla. Em contrapartida, essa grande heterogeneidade pode mascarar potenciais achados associados a subgrupos mais homogêneos, que só poderiam ser observados em estudos retrospectivos (59).

No presente trabalho, selecionamos 18 amostras, subdivididos em 9 amostras de pacientes diagnosticados com sepse e 9 diagnosticados com choque séptico. As amostras selecionadas são heterogêneas quanto ao sítio de infecção, sendo 8 pacientes com infecção de trato respiratório, 6 pacientes com infecção do trato urinário e 4 amostras com outros focos infecciosos, como apresentado na Tabela 3.1, corroborando com os dados da literatura que o classificam infecções do trato respiratório como mais frequente entre os pacientes com sepse (145). Adicionalmente, não houve diferença significativa entre as médias de idade dos grupos, sendo as diferenças de idade, uma questão importante na funcionalidade do sistema imune (146).

Durante o isolamento de VEs por SEC das amostras clínicas, observamos que os perfis de eluição das proteínas plasmáticas foi reprodutível ao longo das 35 frações da cromatografia (Figura 5.5). Entretanto, algumas amostras (amostras dos grupos H e I, exceto a amostra choque do grupo H) apresentaram um perfil de eluição das proteínas deslocado, como observado na Figura 5.5 H e I. Uma hipótese para este problema é a falta de reprodutibilidade entre as cromatografias, quando feitas manualmente. Como não foi possível repetir a cromatografia e devido à falta de reprodutibilidade, optamos por não usar estas amostras nas análises seguintes.

Para avaliar a quantidade das vesículas isoladas, estabelecemos uma colaboração com o grupo científico da PensaBio e usamos a técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) com o equipamento NanoSight NS300 (<https://www.pensabio.com.br/post/pensabio-caso-fiocruz>). A análise por NTA permitiu determinar a faixa de tamanhos das partículas observadas e a concentração de cada amostra. Na literatura, há registros de maiores concentrações de partículas quantificadas no plasma de pacientes com trauma grave, comparados a controles saudáveis, analisados por NTA (147). A concentração de partículas de origem celular específica, como de neutrófilos, também foi observada em maior concentração em amostras de pacientes com sepse, e ainda mais elevada no grupo choque (148). Em nosso resultado de quantificação de partículas por NTA, observamos que concentrações obtidas entre as amostras dos grupos de análise foram variáveis (Figura 5.6) sendo o coeficiente de variação mais baixo, observado nas amostras do grupo controle. A quantidade média de partículas isoladas por grupo de análise, não demonstrou diferença significativa, apesar da média do grupo choque indicar uma maior concentração de partículas, comparado aos demais grupos (Figura 5.8). Futuramente, ao submeter essa mesma análise em uma coorte mais ampla, possamos esclarecer a relação de quantidade de partículas e o quadro clínico de forma mais robusta. Apesar das diferenças na concentração de VEs entre as amostras, não observamos diferenças nas principais faixas de tamanho, que foram entre 50 e 150 nm (Figura 5.7). Adicionalmente, após a obtenção da concentração das proteínas de partículas isoladas, não foi possível estabelecer uma associação direta entre concentração proteica e concentração de partículas por amostra, ainda que aparentemente, algumas amostras do grupo Choque, com concentrações de VEs/ μ l semelhantes ao observado em outros grupos de análise, renderam menos proteínas (Figura 5.9). Diversos fatores podem influenciar esse resultado, como a própria característica da VE, visto que são estruturas também heterogêneas tanto em tamanho bem como em conteúdo de biomoléculas.

É importante ressaltar, que um fator limitante do nosso estudo é a diferença entre a data da coleta, e o tempo de armazenamento das amostras. As amostras clínicas foram coletadas dos pacientes e armazenadas a -80°C no Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR) entre agosto de 2015 e setembro de 2017. As amostras dos doadores saudáveis (controles) foram obtidas ao longo do último semestre de 2019. Uma hipótese é que essa diferença possa ter interferido na integridade das VEs e, conseqüentemente, na concentração destas estruturas e seu conteúdo, uma vez que o método de isolamento escolhido, é dependente da integridade das VEs. Para fins de análises futuras, amostras

de doadores saudáveis podem ser usadas como controle de qualidade, sendo coletadas e armazenadas sob as mesmas condições das amostras clínicas, evitando assim, possíveis diferenças nas análises não relacionadas às condições fisiopatológicas.

A quantificação e a origem celular são informações muito valiosas para compreender a dinâmica do processo de comunicação intercelular, mediado pelas VEs durante a resposta imune. Dados da investigação de Nieuwland e colaboradores, que avaliaram a origem celular de microvesículas (MVs) de pacientes na sepse meningocócica, demonstraram que as MVs de plaquetas predominaram significativamente sobre as de outros tipos celulares avaliados, seguido por MVs de granulócitos (149). Neste estudo, as MVs de origem plaquetária não mostraram alterações no número de partículas, quantificadas no período de admissão, e após 4h, 10h, 16h, 24h e 36h, enquanto MVs derivadas de granulócitos diminuíram durante as primeiras 10 horas após a admissão. A avaliação da origem celular das VEs era um dos nossos objetivos, que não pode ser realizado até o presente momento, mas é uma importante perspectiva.

Tendo abordado as análises sobre isolamento, quantificação e determinação do tamanho das VEs, passamos para a análise do proteoma. Neste trabalho, partindo de um volume fixo de 1,5 mL do pool de frações enriquecidas da SEC, foi possível obter, em todas as amostras, material suficiente para as análises por espectrometria de massas. Nas amostras de pacientes observamos uma concentração média maior de proteínas quando comparado ao grupo controle, entretanto, há variabilidade entre as amostras, em ao menos duas amostras de pacientes, a concentração de proteínas obtida ficou abaixo de 0,170 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabela 5.5).

Após tripsinização e purificação dos peptídeos, os dados adquiridos por espectrometria de massas, foram utilizados para identificação e inferência das proteínas com auxílio do programa *Patterlab for Proteomics* 4.0. Os números absolutos de identificação (Tabela 5.6) a nível de espectros (PSMs), peptídeos e proteínas são mais elevados nos grupos clínicos, especialmente no grupo choque, interessante o grupo choque foi o grupo clínico com a maior média de partículas quantificadas por NTA. Futuramente, uma análise com número maior de amostras poderá esclarecer a possível relação entre quantidade de VEs e proteínas, associadas a gravidade, como apontado em indícios recentes na literatura (150)

Avaliando qualitativamente o proteoma das VEs nos grupos de análise, encontramos proteínas previamente descritas em VEs, como: proteínas da família das

Anexinas (A1 - ID: P04083; A2 - ID: P07355, A3 - ID: P12429, A4: ID: P09525, A5 - ID: P08758, A6 - ID: P08133, A7 - ID: P20073 e A11 - ID: P50995) Clatrina (ID: Q00610/ P53675/ P09496), Tetraspaninas (CD9 - ID: P21926/ P14209, CD81 - ID: P60033, CD151 - ID: P48509, CD53 - ID: P19397); componentes do citoesqueleto: Actina (ID: P63261/ P63267/ P12814/ O75882/ O43707/ Q562R1), Tubulina (ID: Q9H4B7/ P68363/ P68366/ P07437/ Q9NY65/ P0DPH7/ Q9BUF5/ P68371), Moesina (ID: P26038), Cofilina (ID: P23528); Proteoglicanos: Versican (ID: P13611) Biglycan (ID: P21810), Heparan sulfato (ID: P98160); glicoproteínas: Tenascin (ID: P24821), Fibronectina (ID: P02751); enzimas glicolíticas: aldolase A (ID: P04075), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (ID: P04406), Alfa enolase (ID: P06733), Piruvato quinase (ID: P14618) e Lactato desidrogenase (ID: P07195/ P00338); proteínas do complexo de histocompatibilidade: HLA de classe I (ID: P01889/ P10321/ P04439); proteínas transdutoras de sinal da família das pequenas GTPase (CDC42 - ID: P60953, RAC1 - ID: P63000, RAC2 - ID: P15153, RhoA - ID: P61586), e 14-3-3 (YWHAZ - ID: P63104, YWHAE - ID: P62258); proteínas citosólicas: subunidades de proteossoma (ID: Q99436/ P49721/ P20618/ P28074/ P25787/ P60900/ O14818) e entre outras.

Também foi observado nos nossos dados, proteínas que indicam a presença de VEs provenientes de plaquetas e leucócitos: CD42a (ID: P14770), CD42c (ID: P13224), CD42d (ID: P40197), CXCL4 (ID: P10720), CD62P (ID: P16109), CD177 (ID: Q8N6Q3) e CD14 (ID: P08571). Proteínas associadas especificamente a células endoteliais, linfócitos e células dendríticas não foram observadas. Isto sugere que nossas amostras sejam, em sua maioria, VEs oriundas de plaquetas, corroborando com a literatura (149,151).

No banco de dados Vesiclepedia (88) é possível selecionar somente as proteínas de VEs isoladas do plasma humano. Assim, comparamos nossos dados com esta lista, e observamos uma sobreposição de 70%, indicando que nossos resultados estão de acordo com o encontrado por outros grupos de pesquisa. Entretanto, o desafio metodológico acerca do isolamento de VEs do plasma, pode impactar na confiabilidade dos dados depositados nos bancos atuais, especialmente acerca da presença de proteínas plasmáticas, como comentado previamente. Para avaliar, superficialmente, a abundância global das proteínas identificadas em cada grupo de análise, e observar a relevância de proteínas comuns do plasma nas identificações, procuramos observar a distribuição normalizada dos espectros de massas identificados (Figura 5.16), partindo da premissa que, proteínas abundantes tendem a contribuir com mais peptídeos na amostra, e

consequentemente, contribuir com mais espectros identificados. Nesse sentido, as cadeias de fibrinogênio; albumina; haptoglobina; apolipoproteínas C-II, CIII, E, A-I e cadeias de imunoglobulinas, possuem os maiores valores atribuídos a distribuição de espectros identificados (Figura 5.16). Entender o impacto da identificação de proteínas abundantes do plasma, e sua possível interferência na identificação de proteínas de VEs, é uma questão que motiva ao grupo, em dar continuidade no processo de otimização do isolamento de VEs, voltado para análises por espectrometria de massas, buscando enriquecer o proteoma de VEs.

Em seguida, quantificamos o proteoma dos grupos de análise, pelo método de contagem espectral (*spectral counting*)(113). Optamos por considerar as proteínas identificadas em 2 replicatas técnicas, e ao menos 1 peptídeo proteotípico identificado (Tabela 5.6). Considerando a distribuição no diagrama de Venn de todas as proteínas quantificadas (Figura 5.11), observamos uma total de 903 proteínas, desse conjunto, cerca de 60% (543 das 903 proteínas) estão presentes exclusivamente no proteoma das amostras dos pacientes, sendo que as amostras do grupo choque, detém exclusivamente 30% (278 das 903) das proteínas quantificadas.

Em sequência, para analisar o proteoma diferencial dos grupos de análise, pacientes *vs* controles, e sepse *vs* choque, utilizamos o critério em que, as proteínas necessariamente devem ter sido identificadas em ao menos 2 amostras por grupo de análise. Desse modo, ao observarmos a comparação entre os grupos pacientes e controle, praticamente todo o proteoma do grupo controle foi co-identificado nas amostras de pacientes, de modo que, somente 12 proteínas foram exclusivas do grupo controle, dentre elas a Calistatina, proteína que age como potente protetora contra lesão endotelial, já reportada em baixos níveis em pacientes com sepse (152); Glicoproteína fosfolipase D, que age na âncora glicosilfosfatidilinositol; e identificações referentes a cadeias de imunoglobulina. Contrariamente, 356 proteínas foram exclusivas do grupo pacientes (Figura 5.12 A), dessas, 142 estão presentes em mais de 7 das 14 amostras de pacientes. De modo interessante, 7 proteínas foram identificadas em todas as 14 amostras de pacientes, dentre elas, as proteínas do citoesqueleto, talina (ID: Q9Y490), filamina-A (ID: P21333), profilin-1 (ID: P07737), a proteína básica de plaquetas ou CXCL7 (ID: P02775), variante do fator IV plaquetário ou CXCL4v (ID: P10720), 14-3-3 ζ (ID: P63104) e versican (ID: P13611). A interpretação desse conjunto de proteínas identificadas exclusivamente, não podem ser analisadas estatisticamente (determinação de abundância

relativa feita por *fold change*), no entanto estas proteínas contribuem para a interpretação biológica dos resultados.

Em sequência na comparação pacientes *vs* controles, 51,8% dentre o total de proteínas compartilhadas, apresentaram valores de abundância relativa similares nos dois grupos, 25,6% apresentaram diferença de abundância, porém, sem significância estatística, enquanto 22,6% possuem valores de abundância distintos e com significância estatística (Figura 5.13). A heterogeneidade entre o proteoma de VEs dos paciente e controles, pode ser observada através do perfil proteico individual (Figura 5.15) bem como na pontuação do grau de perturbação molecular (MDP) (Figura 5.14), onde a diferença do proteoma de VEs do grupo controle para o grupo clínico foi evidente, entretanto, não foi possível observar uma distinção entre o proteoma de VEs entre sepse e choque, através desses métodos de análise. Através do escore MDP também foi possível observar que, apesar da presença de amostras de pacientes com características clínicas mais distintas (portadores de neoplasia não hematológica e necessidade de aporte renal) essas amostras permaneceram dentro da média dos grupos, com poucas exceções. (Figura 5.14)

Utilizando o proteoma diferencial do proteoma do grupo de pacientes, a análise de enriquecimento de vias, foi realizada com a base de dados do Reactome. Essa análise demonstrou que o proteoma das VEs de pacientes está associado diversas vias, 120 especificamente, das quais destacamos: Vias associadas a ativação plaquetária; sistema imune inato; comunicação célula-célula e interações entre superfície com a parede vascular, que serão discutidas a seguir.

Em nossos dados, encontramos proteínas do complexo GP1b-IX-V (GP1B - ID: P07359, GP5 – ID: P40197, GP9 – ID: P14770), CD36 (ID: P16671), Fator de von Willebrand (ID: P04275), Integrinas ($\alpha 6$ – ID: P23229, β II – ID: P05107, β I – ID: P05556) Selectina (P-selectina – ID: P16109, E-selectina – ID: P16581), Fatores de Coagulação (VIII – ID: P00451, IX – ID: P00740 e X – ID: P00742) e diversas proteínas de modulação do citoesqueleto, que estão associadas diretamente as vias de ativação plaquetária.

As plaquetas e as VEs plaquetárias são alvos de investigação regulares, pelo seu papel em mecanismos importantes na fisiopatologia da sepse, como sua participação na dinâmica entre inflamação, coagulação e lesão endotelial (153,154). Especificamente, a injúria ao endotélio que ocorre na sepse, resulta na rápida adesão das plaquetas à parede

do vaso, seguida da etapa de agregação (Figura 6.1). Na ativação da coagulação induzida por inflamação, as plaquetas podem ser ativadas diretamente por endotoxinas ou por mediadores pró-inflamatórios (155). O processo de ativação plaquetária desencadeia a liberação de VEs com perfil pró-trombótico, que possuem uma superfície catalítica para o complexo de enzima protrombinase (fatores Va e Xa). Apresentam também sítios de ligação específicos para os fatores V, IX e VIII, que podem estar mais concentrados em VEs do que na própria plaqueta. No caso dos fatores Va e VIIIa especificamente, há relatos de uma concentração 10 vezes superior em VEs comparado a plaquetas (156). As VEs plaquetárias possuem a atividade pró-coagulante aumentada em aproximadamente 50-100 vezes, em comparação as plaquetas (157). A relação direta entre VEs e coagulação especificamente, tem atraído interesse dos investigadores, especialmente pela contribuição das VEs com perfil pró-trombótico no estabelecimento da Coagulação Intravascular Disseminada (CID). Interessantemente, Terrisse e colaboradores observaram a formação de cordões de plaquetas em células HUVEC, após o tratamento com VEs de origens endoteliais, monocíticas ou plaquetárias. Este perfil pró-adesivo foi associado ao aumento da expressão de moléculas de adesão plaquetária em células endoteliais após o tratamento com as VEs, do qual a glicoproteína 1b (GP1b), foi destacada por sua contribuição no processo de adesão, uma vez que a redução na formação de cordões de plaquetas foi observada após a adição de um anticorpo anti-GP1b (158). Em nossos resultados, a glicoproteína GP1b (ID: P07359) apresentou valor de abundância relativa quatro vezes superior no grupo de pacientes, quando comparada ao controle. Adicionalmente, o Fator de von Willebrand (ID: P04275) está três vezes mais abundante no grupo de pacientes. Este importante ligante do componente do complexo glicoproteico GP1b-IX-V foi observado em modelo de sepse induzida por Ligadura e Punção Cecal (CLP), onde os camundongos *knockout* para o Fator de von Willebrand, obtiveram melhor sobrevida, comparados aos selvagens, enquanto os camundongos deficientes do receptor GP1b não apresentaram o mesmo resultado (159).

VEs: Perfil pró-coagulante

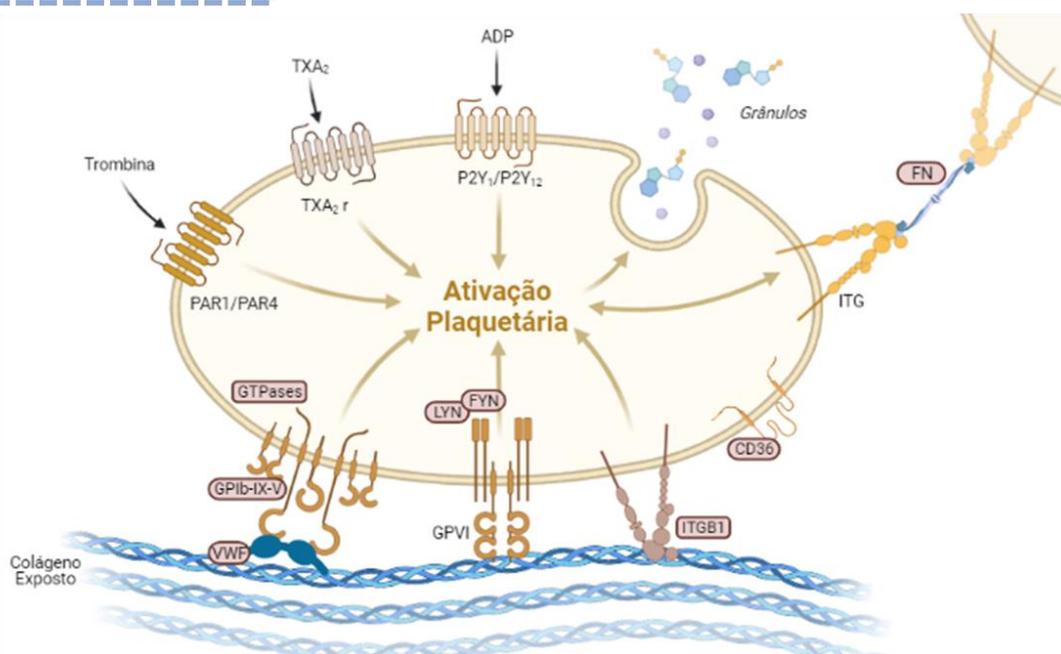


Figura 6.1 – Ilustração do papel funcional das proteínas identificadas no proteoma de VEs dos Pacientes, envolvidas na Adesão, seguido da Ativação Plaquetária. As interações entre proteínas de superfície (complexo $GPIb-IX-V$ e Integrinas) com componentes subendoteliais expostos (colágeno e VWF), disparam os mecanismos de ativação plaquetária, envolvendo uma etapa de intensa remodelação do citoesqueleto e na secreção de diversas moléculas como grânulos plaquetários, indicando que as VEs modulam tais processos decorrentes da ativação plaquetária.

Além de seu papel bem compreendido na hemostasia, as plaquetas ativadas e as VEs plaquetárias participam do direcionamento da resposta imune em outros mecanismos pró-inflamatórios. Como exemplo, ligantes da $GP1b$, como ligante 1 da glicoproteína P-Selectina ($PSGL-1$) de neutrófilos, formam complexos que potencializam a migração do leucócito para o meio extravascular, conferindo uma maior capacidade de ativação comparado às células desacopladas ao ligante $GP1b$ (160). A interação de VEs e leucócitos é um mecanismo de interesse investigativo. Trabalhos recentes demonstraram que a interação entre VEs e neutrófilos leva a produção de redes de cromatina, contendo histonas e proteínas granulares, denominadas de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos ($NETs$), que caracteriza uma forte correlação entre a trombose e a inflamação (161). Clark e colaboradores, demonstraram que durante a sepse grave, as plaquetas podem desencadear a ativação de neutrófilos sequestrados na microvasculatura de forma dependente de $TLR4$, levando à formação de $NETs$ nessa região, que prendem as bactérias na vasculatura, à custa de danos endoteliais e teciduais (162). Mesmo na falta

de evidências diretas acerca das VEs exercendo tal função, este é um importante indício de um possível efeito das VEs de plaquetas nos danos vasculares gerados por NETs.

Adicionalmente, as próprias VEs provenientes de neutrófilos ativados, contribuem na disseminação de moléculas pró-inflamatórias (Figura 6.2), visto que as VEs desse tipo celular contêm os mesmos componentes que as NETs (163). Uma análise proteômica de microvesículas de neutrófilos ativadas por fMLP (N-formil-1-metionil-1-leucil-fenilalanina), identificou importantes proteínas pró-inflamatórias como S100A8, S100A9, mieloperoxidase e catepsina G (164). A mieloperoxidase pode se ligar ao heparan sulfato do glicocálice por interação iônica, que induz a liberação de proteinases granulares de neutrófilos com consequente liberação de sindecan-1 e comprometimento do glicocálice (165). A catepsina G é conhecida por aumentar a permeabilidade endotelial à albumina através do descolamento do inibidor 1 do ativador do plasminogênio da matriz subendotelial, causando o rearranjo da F-actina, além disso, a catepsina G pode degradar a VE-caderina e prejudicar a integridade da junção endotelial (166) Em conjunto, esses dados sugerem que VEs derivadas de neutrófilos podem ter efeitos no aumento da permeabilidade endotelial (167). Curiosamente, algumas dessas proteínas citadas, também foram identificados no proteoma de VEs do pacientes, especialmente nas amostras clínicas mais graves, como catepsina G (ID: P08311), mieloperoxidase (ID: P05164) e a proteína S100A9 (ID: P06702), além de outras proteínas pró-inflamatórias como a Defensina, alfa 3 (ID: P59666) e a lisozima C (ID: P61626) (Figura 6.2)

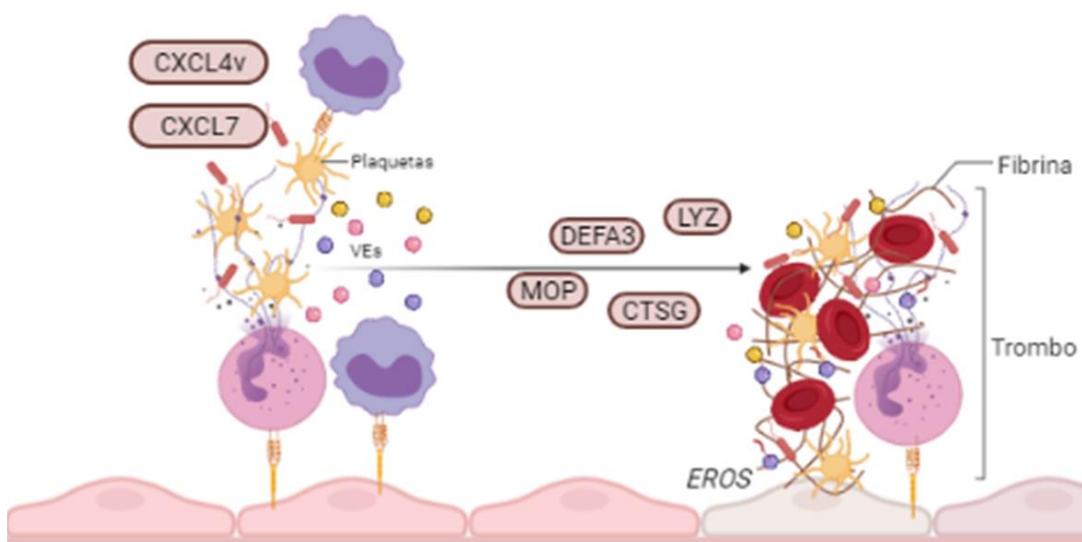


Figura 6.2 - Ilustração do papel funcional das proteínas identificadas no proteoma de VEs dos Pacientes, envolvidas no recrutamento e degranulação de neutrófilos. CXCL4v e CXCL7 são quimiocinas potentes que atraem leucócitos para o sítio de infecção, enquanto proteínas pró-

inflamatórias contidas nas VEs secretadas contribuem para formação de trombos e podem prejudicar a integridade das células endoteliais.

Também observamos em nossos resultados um conjunto de proteínas com perfil pró-inflamatório envolvidas na quimiotaxia enriquecidas no proteoma das amostras de Pacientes, com destaque para as quimiocinas CXCL7 (ID: P02775), CXCL4L1 (ID: P10720) e a proteína Peptidil-prolil cis-trans isomerase A (ID: P62937). A Proteína básica pró-plaquetária humana, CXCL7, tem ação quimiotática em neutrófilos, por meio do produto de sua clivagem pós-traducional, resultando no peptídeo NAP - 2 (168); a variante CXCL4L1, uma quimiocina com características inflamatórias mais pronunciadas, e com ação de inibição da angiogênese mais potente, capaz de inibir a quimiotaxia de células endoteliais quando comparado ao CXCL4 / PF-4 (169,170). Corroborando a esse achado especificamente, é importante ressaltar que a Angiopoetina *like 6* (ID: Q8NI99), um fator pró angiogênico, foi expresso negativamente nas amostras de pacientes, comparado aos controles. A Peptidil-prolil cis-trans isomerase A, que de modo semelhante, possui forte efeito quimiotático em leucócitos, além de exercer outras funções como ativação de células endoteliais para um perfil pró-inflamatório, estimulando a ativação de NF-kB, ERK, JNK e p38 MAP-quinases, induzindo a expressão de moléculas de adesão, como E-selectina (ID: P16581) e VCAM1 (ID: P19320), ambas identificadas no proteoma de pacientes, assim como o estímulo a apoptose das células endoteliais, promovendo a expressão de FOXO1 de CCL2 e BCL2L1 (171,172).

Complementando os mecanismos pró-inflamatórios observados, algumas proteínas envolvidas no sistema complemento também compõe o proteoma identificado nas amostras de Pacientes, como a proteína C9 (ID: P02748) e a proteína reguladora CD59 (ID: P13987) (Figura 6.3). De modo particular, a presença de CD59 pode conferir uma importante proteção as VEs circulantes, visto que inibem diretamente os fatores C8 (ID: P07358) e C9 do sistema complemento. Por outro lado, alguns inibidores da via foram expressos negativamente nas amostras clínicas, como a proteína de ligação a C4b (ID: P20851) e Fator H (ID: P08603). Esses achados, ainda que mais pontuais, corroboram com trabalhos que indicam as VEs como estruturas capazes de apoiar a ativação do sistema complemento, mais especificamente acerca das VEs de plaquetas, propostas como uma forma alternativa de enviar proteínas do complemento para alvos específicos na circulação (173).

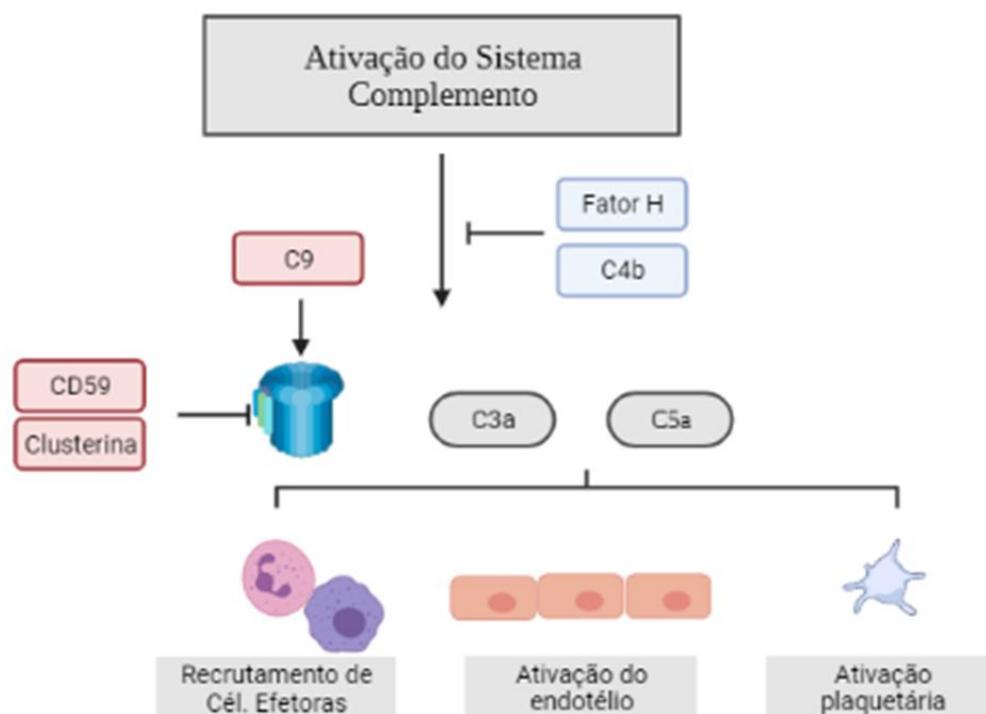


Figura 6.3 - Ilustração do papel funcional das proteínas identificadas no proteoma de VEs dos Pacientes, envolvidas na ativação do Sistema Complemento. Proteínas que conferem proteção contra o complexo de ataque à membrana como CD59, podem auxiliar na viabilidade das VEs circulantes. Interessantemente, fatores que regulam a formação de C3a e C5a, importantes componentes da resposta imune, foram negativamente regulados no proteoma dos pacientes.

Em relação ao mecanismo de modulação da dinâmica do citoesqueleto, destacamos no nosso dado proteínas como as pequenas GTPases (CDC42 – ID: P60953, RAC1 – ID: P63000, RAC2 – ID: P15153, RhoA - ID: P61586, RAb10 – ID: P61026); fosfoproteína estimulada por vasodilatador (ID: P50552); filamina A (ID: P21333); proteína 1 associada à ciclase (ID: Q01518); cofilina (ID: P23528) e profilina (ID: P07737). O remodelamento do citoesqueleto é um componente importante da resposta imune, fundamental na própria ativação plaquetária e a integridade da barreira endotelial, que serão abordados resumidamente a seguir.

As plaquetas sofrem mudanças profundas de conformação morfológica após ativação, mecanismo mediado pela ligação de um agonista ao receptor na superfície plaquetária, levando ao aumento de cálcio e a alterações na sinalização intracelular, que promovem os rearranjos necessários do citoesqueleto, para o aumento da afinidade do receptor plaquetário, fundamental para a agregação plaquetária e a formação de trombos (161). As proteínas da família de pequenas GTPases, CDC42 e RAC1, foram algumas das proteínas com maior grau de interação na rede P.P.I do grupo clínico (Figura 5.23) e

são moduladoras da formação de filópodes e lamelipódios nas plaquetas (129,174). Um estudo recente conduzido por Jonhson e colaboradores demonstrou que VEs também podem manter sua própria dinâmica do citoesqueleto ativa, possibilitando as mudanças conformacionais e garantindo a capacidade de motilidade (175).

A regulação da barreira endotelial também requer uma coordenação eficiente do citoesqueleto, sendo fundamental na preservação da integridade da barreira, de modo que, a perturbação da dinâmica da actina pode mudar o equilíbrio da estabilização do filamento cortical e desestabilizar as fibras de estresse, causando disfunção da barreira e o aumento da permeabilidade vascular, assim como pode contribuir para o recrutamento excessivo de células imunes nos sítios de infecção. Dentre sua vasta gama de funções, a RAC1 em conjunto com VASP, foi considerada como essencial na proteção da integridade da barreira endotelial (176). Em outra observação experimental quanto a manutenção da barreira endotelial, foi observado que a depleção de VASP e filamina1 com siRNAs específicos, exacerbou significativamente a barreira de células quiescentes e a disfunção de barreira endotelial induzida por LPS, sugerindo papel protetor dessas proteínas, especialmente a VASP, cuja inibição foi associada à perda mais grave de coloração periférica de ZO-1 em resposta a LPS (177).

Após avaliar as relações entre as proteínas envolvidas na ativação plaquetária e os consequentes mecanismos pró-trombóticos e pró-inflamatórios associados, também investigamos um conjunto de proteínas que enriqueceram as vias de interações celulares, identificadas do proteoma diferencial de VEs de pacientes, dentre elas: Claudina 5 (ID: O00501); F11R ou JAM-A (ID: Q9Y624); E-Selectina (ID: P16581); P-Selectina (ID: P16109); CD44 (ID: P16070); CD99 (ID: P14209) e integrina $\alpha 6\beta 1$ (ID: P23229/P05556), que estão enriquecidas entre as amostras de pacientes, e indicam a capacidade das VEs em modular a barreira endotelial, bem como a adesão e transmigração celular, mecanismos adjacentes a resposta imune pró-inflamatória (Figura 6.4). A função das VEs em modular os processos de adesão e migração celular tem sido alvo de interesse em contextos fisiopatológicos (178). Um estudo com microvesículas de leucócitos isolados de pacientes com sepse, demonstrou que as microvesículas possuíam aumento das moléculas de adesão, indicando um papel essencial das dessas VEs na ativação endotelial e na interação leucócito-endotélio na sepse (179). Outros trabalhos demonstraram similarmente o papel das VEs de plaquetas como mediadores da adesão célula-célula, observadas em neutrófilos, como citado anteriormente, assim como monócitos e outros tipos celulares (180,181). Apesar de alguns trabalhos abordarem a importância dessas

moléculas de adesão no contexto da sepse (182,183), não há uma associação clínica documentada acerca da presença das VEs e moléculas de adesão, com desfecho clínico em paciente com sepse.

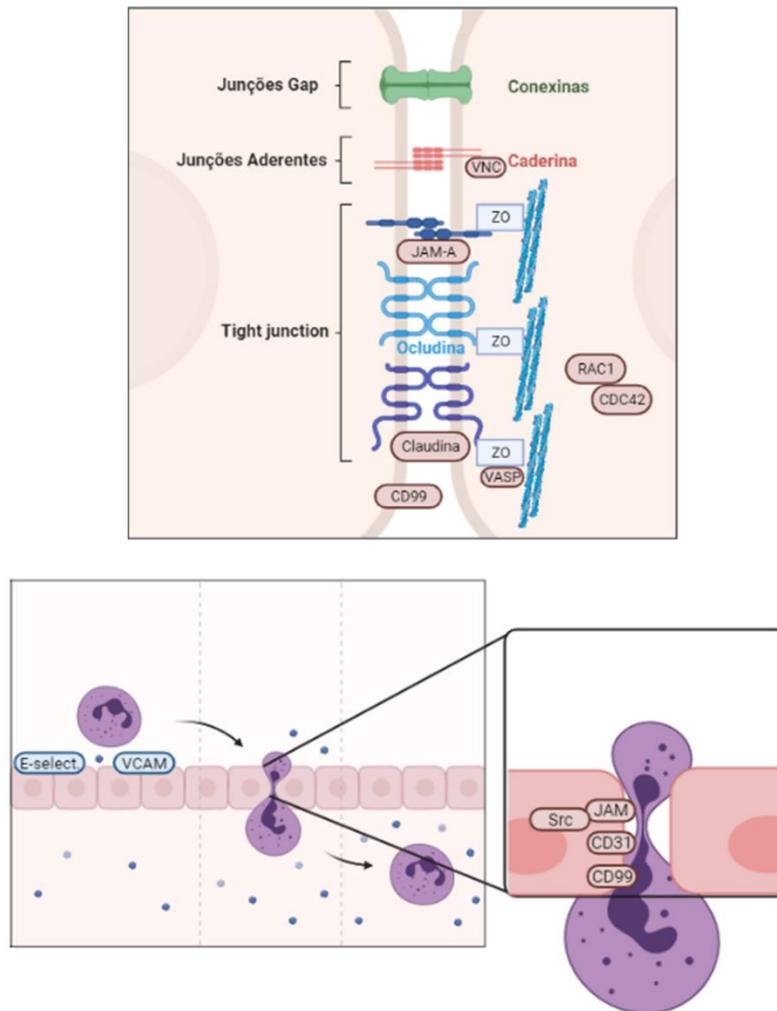


Figura 6.4 - Ilustração do papel funcional das proteínas identificadas no proteoma de VEs dos Pacientes envolvidas Interação Célula-Célula bem como a Migração de leucócitos. Proteínas como a Molécula de adesão juncional (JAM-A) e Claudinas, estão ligadas a proteínas intracelulares ancoradas ao citoesqueleto, promovendo a estabilidade às junções, bem como na regulação de abertura e fechamento das mesmas, processo necessário para migração das células, que por sua vez conta com a participação de um conjunto de proteínas que coordenam desde a etapa de interação das células com a superfície endotelial, como as selectinas e moléculas de adesão, até o processo final da migração das células, como PECAM1 (CD31) e CD99

Interessantemente, a adesão célula-matriz também foi uma via enriquecida pelo proteoma diferencial do grupo pacientes, associado as proteínas da membrana basal devido à presença de Colágeno (ID: P39060/ P08572/ P02461); Nidogênio (ID: P14543); Laminina (alpha 2 – ID: P24043, gamma 1 – ID: P11047); e proteínas como Versican

(ID: P13611); Vitronectina (ID: P04004) e Talina (ID: Q9Y490). Uma das proteínas de maior diferença de *fold change* entre pacientes e controles foram a laminina alpha 2 e gamma 1, com abundância relativa 5 e 4 vezes superior respectivamente. Em concordância, também foram identificados componentes da integrina $\alpha\beta 1$ que é conhecidamente um fator crítico na ligação entre plaquetas e a laminina (184).

A presença de proteínas de adesão e proteínas da matriz, como a própria laminina, encontradas ao longo das superfícies das VEs, também podem servir como mediadores da interação com seus receptores correspondentes nas células receptoras, promovendo o *docking* das VEs (185). De modo interessante, foi proposto recentemente, que o mecanismo pelo qual as VEs captam moléculas da matriz, ocorre através da endocitose de tais moléculas, para subsequente re-secreção na superfície das VEs. Esta endocitose contínua garantiria uma fonte abundante de VEs portadores da MEC, que podem desempenhar um papel importante na migração celular (186).

De maneira geral, os principais achados no proteoma diferencial de VEs do grupo de pacientes, observamos que as VEs podem influenciar o direcionamento da resposta imune, por diferentes mecanismos. Esse conjunto de proteínas citadas até o momento, reforça a importância das VEs nos mecanismos de ação pró-trombótica e pró-inflamatória, com possíveis consequências diretas sobre o endotélio, corroborando com dados de observações pontuais, que indicam as VEs como estruturas mediadoras da comunicação celular na resposta imune, e que podem contribuir com mecanismos potencialmente prejudiciais, associados ao estabelecimento de disfunções orgânicas. No entanto, compreender o real impacto das VEs no contexto clínico da sepse, requer investigações complementares, a fim de direcionar o potencial uso das VEs em novas estratégias terapêuticas, que tragam benefícios concretos a uma condição clínica complexa, evitando possíveis equívocos, como observado nas inúmeras tentativas focadas em manipular pontualmente, fatores envolvidos em sistemas complexos que tendem a perturbar significativamente a homeostase (122). Muitos ensaios clínicos dessa natureza produziram resultados clínicos insatisfatórios, como o uso da proteína C ativada recombinante (rAPC); concentrados de antitrombina derivada do plasma e inibidor da via do fator tecidual recombinante (rTFPI - inibe diretamente o Fator Xa e em complexo com o Fator Xa, inibe Fator Tecidual/FVIIa), que não resultaram em redução da mortalidade efetivamente. Entretanto, a compressão do envolvimento das VEs nos mecanismos pró-trombóticos, por exemplo, pode beneficiar os subgrupos de pacientes que desenvolvem a CID desencadeada por sepse (123). Visto que, um estudo observacional prospectivo

recente testou o de uso das VEs para predição da CID em 265 pacientes com choque séptico. Nesse trabalho, foi concluído que a determinação de tempo de protrombina, somado a presença de microvesículas CD105 + derivadas do endotélio e contagem de plaquetas na admissão podem predizer a ausência de coagulação intravascular disseminada (124).

Desse modo, são necessários investigações complementares, para avaliar as associações entre o proteoma de VEs circulantes e o estabelecimento da disfunção orgânica, uma vez que a dinâmica entre secreção e *clearance* das VEs ao longo da fase aguda, de recuperação ou óbito, bem como o perfil fenotípico das VEs nessas condições, não foram esclarecidas até o momento na literatura. Esse estudo fornece uma caracterização fundamental do perfil proteico da VEs isoladas nas primeiras horas após diagnóstico de sepse ou choque séptico, que corrobora com o potencial envolvimento dessas estruturas nos processos iniciais da sepse e seu agravamento.

Em sequência, avaliando os grupos clínicos sepse e choque, em busca de um possível perfil proteico associado a gravidade, observamos que esses dois grupos possuem o proteoma semelhante, tanto nas análises de perfil de abundância (Figura 5.15), nas análises de distribuição de proteínas identificadas (Figura 5.12) e pelas diferenças na abundância entre as proteínas comuns nos dois grupos de análise (Figura 5.13). A definição atual de sepse e choque séptico atualizada após o consenso Sepsis-3, estabelece a presença de disfunção orgânica para diagnóstico de sepse, de modo que a variável para o subgrupo mais grave é determinada por alterações hemodinâmicas e metabólicas, de certa forma isso pode ter contribuído para a dificuldade em distinguir mais claramente um perfil proteico entre esses dois grupos, desse modo, discutiremos alguns achados interessantes de maneira mais pontual.

As principais diferenças entre os grupos de análise, estão na quantidade de proteínas exclusivas. Em um total de 688 proteínas identificadas e distribuídas, 97 foram exclusivas do grupo choque e 31 exclusivas ao grupo sepse. Enquanto na análise estatística sobre a abundância das 560 proteínas compartilhadas, aproximadamente 93% apresentaram abundância relativa semelhante entre os dois grupos. Dentre as proteínas que apresentaram diferença de abundância, está a subunidade alfa 2 da laminina (ID: P24043), previamente destacada na análise de *fold change* das amostras de pacientes. Nesta segunda análise, a abundância relativa da laminina foi 2,9 vezes superior no grupo choque, em relação a sepse.

Dessa forma, o proteoma das VEs das amostras do grupo choque, composto majoritariamente pelas proteínas exclusivas, enriqueceram as vias: Sistema Imune Inato; Sinalização celular via citocinas e interleucinas; Interações da organização extracelular bem como Interações Celulares.

Como determinado pelo Sepsis-3, a definição de choque séptico determina que, a fisiologia circulatória e o metabolismo celular encontram-se alterados. Nesse ponto, moléculas que participam de mecanismos associados a regulação hemodinâmica, como as moléculas presentes nas junções endoteliais, despertam particular interesse. A molécula de adesão juncional A (ID: Q9Y624) e a Claudina-5 (ID: O00501), ambas identificadas no grupo choque, são componentes da *tight junction* (TJ) que garantem a integridade da barreira endotelial (187). Kondo e colaboradores demonstraram pela primeira vez que a claudina-5 pode ser desmontada da TJ de uma maneira dependente do sinal, por trombina ou agonistas de PAR1 (188). Enquanto Ozaki e colaboradores observaram que o tratamento de células HUVECs com TNF- α e IFN- γ , teria causado o desaparecimento de JAM das junções intercelulares, porém, análises complementares, demonstraram que a quantidade de JAM não tinha sido reduzida, indicando que a proteína mudou sua distribuição em resposta às citocinas pró-inflamatórias (189). Atualmente a JAM-A tem sido cada vez mais caracterizada, sendo identificada também na superfície de plaquetas e leucócitos, adquirindo um importante papel nos mecanismos de adesão de plaquetas ao local de inflamação no endotélio (190), bem como na migração de leucócitos (191).

Nesse contexto, outras proteínas importantes para migração transendotelial de leucócitos, também foram identificadas preferencialmente no grupo choque, como a CD99 (ID: P14209), outro componente presente nas junções endoteliais (192) CD43 (ID: P16150), associada a regulação dinâmica do tráfego de linfócitos T CD4 em locais de inflamação (193) e proteínas CD44 (ID: P16070), associada mediação da integridade da barreira vascular, via regulação da PECAM-1, como também na proliferação e apoptose das células endoteliais microvasculares (194)

Em seguida, como previamente citado, um conjunto de proteínas pró-inflamatórias que enriquecem a via de sistema imune inato/degranulação de neutrófilos, estão presentes de modo mais acentuado em amostras do grupo choque. De modo particular a catepsina G (ID: P08311), foi alocada como exclusiva do grupo choque, presente em 5 das 7 amostras do grupo. Além de sua função bem estabelecida na eliminação de patógenos, a catepsina G também potencializa a ação de quimiocinas,

promovendo a ativação plaquetária via interação direta com o receptor PAR4, estimulando a produção de mediadores pró-inflamatórios por monócitos, além de promover alterações na permeabilidade vascular, a nível da microcirculação, através da degradação de componentes das junções celulares (195). De modo similar, o papel da mieloperoxidase (ID: P05164), também identificada no proteoma do grupo choque, está associado a funções pró-inflamatórias importantes, que podem levar a lesão oxidativa de células do endotélio (165). Outro achado interessante no proteoma do grupo choque, é a presença de CD14 (ID: P08571), visto que recentemente, Alarcón-Vila e colaboradores demonstraram pela primeira vez, que o estímulo ao receptor P2X7 induz a liberação de CD14 em vesículas extracelulares, resultando em uma redução da glicoproteína na membrana plasmática de macrófago. Os autores observaram no modelo murino de sepse, que a atividade do receptor P2X7 é importante para manter níveis elevados de CD14 em fluidos biológicos, e uma diminuição em sua atividade resulta em maior carga bacteriana e danos aos tecidos do hospedeiro (196).

Proteínas com ações reparadoras e anti-inflamatórias também foram atribuídas exclusivamente ao grupo choque, como a Anexina A1 (ID: P04083), Inibidor de elastase de leucócito (ID: P30740), superóxido dismutase mitocondrial (ID: P04179) e peroxiredoxina-2 (ID: P32119), que minimizam os efeitos colaterais causados pelas ações dos mediadores pró-inflamatórios. A Anexina A1 é conhecida como potente mediador anti-inflamatório (197), observada como uma molécula capaz de conferir proteção do tecido em modelo murino de sepse polimicrobial (198). Propriedades anti-inflamatórias de VEs provenientes de neutrófilos, foram associadas a presença da Anexina A1 (67). Os mecanismos de ação protetores da Anexina A1, vão desde a inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios (199), reparo tecidual (200) e no bloqueio da migração transendotelial de leucócitos (201). Particularmente, em um trabalho conduzido por Zhang e colaboradores, foi observado que um peptídeo mimético da Anexina A1 (AC2-26) levou a redução significativa da apoptose de cardiomiócitos induzida por sepse *in vitro* e *in vivo* (202).

Em resumo, o perfil de proteínas associadas ao grupo clínico choque séptico, possui indícios acerca da participação das VEs nos mecanismos associados a gravidade, apesar da pouca distinção com o grupo sepse, ter prejudicado a significância estatística das vias mais expressas, especialmente quanto a proteínas pró-inflamatórias que enriquecem a via de degranulação de neutrófilos (Sistema imune inato), somado a algumas proteínas associadas a junção endotelial.

Quanto as proteínas atribuídas ao grupo sepse, também se observam a presença de mediadores importantes para adesão celular, como P-selectina e ICAM2, porém, a representação das proteínas pró-inflamatórias identificadas, não é suficiente para uma associação robusta com a via, comparado a quantidade superior de proteínas pró-inflamatórias, identificadas no grupo choque (Figura 5.21). Uma diferença interessante também se observa pela abundância da superóxido dismutase 1 (ID: P00441), quatro vezes superior no grupo sepse comparado ao grupo choque. Interessantemente a forma mitocondrial foi alocada exclusivamente no grupo choque. Uma avaliação mais abrangente, com maior número de amostras, pode esclarecer uma possível correlações entre a presença da superóxido dismutase e a gravidade dos pacientes.

De modo geral, com base em nossos resultados, concluímos que essa abordagem investigativa é uma fonte rica para análises de moléculas imunomoduladoras. Comparando nossos achados com um trabalho piloto cujo desenho experimental é semelhante ao aplicado nesse estudo, Morris e colaboradores (94) aplicaram a abordagem proteômica *shotgun* em exossomos isolados de pacientes com sepse, através de kit com microesferas magnéticas. A caracterização das VEs isoladas demonstrou um resultado semelhante ao observado em nossos resultados, onde as VEs apresentaram tamanho entre 70 e 120 nm aproximadamente, entretanto a metodologia utilizada pelo grupo (microscopia eletrônica de transmissão) não permitiu que os autores observassem o conjunto de VEs de modo amplo, como observado na análise por NTA realizado nesse projeto. Adicionalmente, o proteoma identificado no trabalho de Morris e colaboradores apontou diferenças pontuais em proteínas conhecidamente abundantes do plasma, como proteína amilóide sérica A, alfa-2-macroglobulina, proteína C reativa, fragmentos de imunoglobulinas entre outras. Os autores levantam a hipótese da presença dessas proteínas essencialmente oriundas dos exossomos, entretanto, não houve nenhum método ortogonal para determinação da presença dessas proteínas em exossomos especificamente, e nenhuma análise acerca do intervalo dinâmico da abundância global dessas proteínas foi realizada. Em nossos resultados, essa discussão foi abordada como uma etapa importante na avaliação do proteoma identificado, onde observamos que a maior parte da distribuição dos espectros de massas identificados, pertencem a um pequeno grupo de proteínas comuns do plasma, com a própria proteína amilóide sérica A; albumina e cadeias de imunoglobulinas. Entendemos que é importante compreender o impacto que essas diferenças de abundância no proteoma identificado podem exercer na identificação de proteínas de menor abundância, quando analisadas por espectrometria de

massas. Entretanto, mesmo conhecendo a abundância global das proteínas identificadas em nosso estudo, fomos capazes de enriquecer a caracterização do proteoma identificado nas VEs isoladas, partindo de um volume de plasma de 400 µl, enquanto no trabalho de Morris e colaboradores, 1 mL de plasma foi utilizado para a identificação do proteoma de exossomos, que não resultou no enriquecimento observado em nosso trabalho.

Em um trabalho piloto voltado para análise prognóstica, Yan Xu e colaboradores avaliaram o proteoma de exossomos isolados de um paciente com sepse em diferentes tempos de internação. O método de obtenção de exossomos por ultracentrifugação através de um Optiprep™, foi eficiente em enriquecer o proteoma analisado, partindo de um volume de 300 µl, os autores identificaram mais de 230 proteínas monitoradas nos 6 tempos de análise. Semelhante ao observado em nossos resultados, as faixas de tamanho das VEs obtidas também permaneceram majoritariamente entre 50 e 150 nm. Embora a caracterização dos componentes celulares também tenha sido semelhantes ao observado em nosso estudo, quanto ao enriquecimento de termos como Região e Espaço Extracelular, Membrana Plasmática, Citoesqueleto entre outros, os autores mantiveram a exploração do dado com foco na identificação de possíveis marcadores prognósticos, propondo a proteína serina palmitoiltransferase 3 (SPTLC3) como um possível candidato a biomarcador (203).

Em contrapartida aos trabalhos previamente citados, optamos por explorar a capacidade da abordagem proteômica *shotgun* em fornecer uma caracterização ampla do proteoma analisado, com auxílio de um método simples para obtenção de VEs do plasma, utilizando colunas cromatográficas rapidamente montadas no próprio laboratório. O perfil majoritariamente pró-inflamatório/trombótico observado no proteoma de VEs dos pacientes, condiz com os dados mais recentes, que apontam as VEs como mediadores de mecanismos importantes no estabelecimento da sepse (59). Nos nossos resultados, a análise entre os grupos clínicos sepse e choque tem potencial como fontes de informações na distinção desses dois grupos clínicos, entretanto, melhorias nas etapas de preparo das VEs e avanços em ferramentas de análises de bioinformática, parecem fundamentais para tornar essa etapa mais robusta, visto que características individuais de amostras clínicas, podem dificultar a interpretação biológica desses dados. Futuramente, análises complementares como a determinação da origem celular das VEs circulantes, e a inclusão de amostras referentes aos dias posteriores a internação, podem contribuir significativamente na compreensão da sinalização celular mediada por VEs durante a sepse.

7. Conclusões

Mostramos que nosso protocolo de isolamento de VEs por SEC para fins de análises por espectrometria de massas, foi mais eficiente comparado aos demais métodos testados. Esse método cromatográfico é de simples execução e tem potencial para otimização para análises proteômicas.

Os nossos resultados das análises proteômicas demonstraram que as VEs são uma fonte rica de informação biológica que está associada a mecanismos fisiopatológicos em amostras clínicas de sepse. Observamos diferença no perfil proteico mais acentuada quando comparamos pacientes *vs* controles que na comparação sepse *vs* choque séptico.

Na comparação pacientes *vs* controles identificamos proteínas associadas a mecanismos pró-inflamatórios e pró-trombóticos; envolvidas nas vias de ativação plaquetária; nas interações célula-célula, especialmente proteínas envolvidas na transmigração endotelial dos leucócitos; e na degranulação de neutrófilos. Na comparação sepse *vs* choque séptico observamos proteínas envolvidas principalmente na degranulação de neutrófilos, identificadas exclusivamente nas amostras de pacientes com choque séptico.

Nosso estudo fornece dados de uma ampla caracterização proteômica de VEs provenientes de amostras clínicas, que corroboram com a literatura mais recente, indicando as VEs como estruturas mediadoras da comunicação celular na resposta imune e capazes de coordenar mecanismos envolvidos no estabelecimento da sepse. A caracterização de VEs circulantes de pacientes com sepse, contribui na compreensão dos mecanismos moleculares associados a desregulação da resposta imune, bem como, pode fornecer uma nova fonte para estratégias terapêuticas futuras.

Perspectivas

- Avaliar a origem celular das VEs isoladas.
- Reavaliar os dados com abordagens alternativas (learning machine – Diagnoprot) em busca de possíveis perfis que discriminem o proteoma entre sepse e choque.
- Ampliação da coorte.
- Validar as proteínas associadas a vias de interesse como a modulação da barreira endotelial por VEs (Exemplos: Claudinas, JAMA, CD31 e CD99) e a via de interação/ativação dos neutrófilos (Exemplos: CXCL4v, CXCL7, Defensinas, Lisozimas, Mieloperoxidase e Catepsina G).

REFERÊNCIAS

1. Lewis Thomas. Sepsis and Septic Shock: A History. *Crit Care Clin* [Internet]. 2009;25(1):83–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.003>
2. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word “sepsis” [1]. Vol. 32, *Intensive Care Medicine*. Springer; 2006. p. 2077.
3. Gyawali B, Ramakrishna K, Dhmoon AS. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med*. 2019;7:205031211983504.
4. Casanova, Abel. The Genetic Theory of Infectious Diseases: A Brief History and Selected Illustrations SUPPLEMENTAL APPENDIX SELECTED ILLUSTRATIONS OF MAJOR ADVANCES IN THE HUMAN GENETICS OF INFECTIOUS DISEASES. *Suppl Mater Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013;215–43.
5. Thomas L. Germs. *N Engl J Med*. 1972;287:553–555.
6. 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* [Internet]. 1989 May [cited 2020 May 17];17(5):389–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2651003>
7. 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. In: *Chest*. 1992. p. 1644–55.
8. Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: Time for change. *Lancet* [Internet]. 2013 Mar 2;381(9868):774–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23472921>
9. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. In: *Critical Care Medicine*. *Crit Care Med*; 2003. p. 1250–6.
10. Ward NS, Levy MM. Sepsis: Definitions, Pathophysiology and the Challenge of Bedside Management. *Sepsis: Definitions, Pathophysiology and the Challenge of Bedside Management*. 2017.
11. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J Am Med Assoc*. 2016;315(8):801–10.
12. Vincent, Jean-Louis MD, PhD, FCCM; de Mendonca, Arnaldo MD; Cantraine, Francis MD; Moreno, Rui MD; Takala, Jukka MD, PhD; Suter, Peter M. MD, FCCM; Sprung, Charles L. MD, JD, FCCM; Colardyn, Francis MD; Blecher SM. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction... : *Critical Care Medicine* [Internet]. *Critical Care Medicine*. 1998 [cited 2020 May 24]. Available from: https://journals.lww.com/ccmjournal/Abstract/1998/11000/Use_of_the_SOFA_score_to_assess_the_incidence_of.16.aspx

13. WHA. Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis [Internet]. Vol. 140, World Health Organization. 2017 [cited 2020 Jun 9]. Available from: <https://www.who.int/servicedeliverysafety/areas/sepsis/en/>
14. Naghavi M, Wang H, Lozano R, Davis A, Liang X, Zhou M, et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* [Internet]. 2015 [cited 2020 Jun 9];385(9963):117–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>
15. 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. Vol. 193, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016. 259–272 p.
16. Finfer S, Machado FR. The global epidemiology of sepsis does it matter that we know so little? *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(3):228–30.
17. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* [Internet]. 2020;395(10219):200–11. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)
18. 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;17(11):1180–9.
19. Neira RAQ, Hamacher S, Japiassu AM. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. *PLoS One*. 2018;13(4):1–15.
20. Lelubre C, Vincent JL. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2018;14(7):417–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-018-0005-7>
21. Vincent J, Marshall J, Anzueto A, Martin CD, Gomersall C. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. 2009;302(21):2323–9.
22. Sales Júnior JAL, David CM, Hatum R, Souza PCSP, Japiassú A, Pinheiro CTS, et al. Sepse Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2006;18(1):9–17.
23. Leligdowicz A, Dodek PM, Norena M, Wong H, Kumar A, Kumar A. Association between source of infection and hospital mortality in patients who have septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(10):1204–13.
24. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and Self-Tolerance in the Immune System: Turning Lymphocytes off Luk [Internet]. Vol. 269, *N. Engl. J. Med*. 1995 [cited 2021 Mar 2]. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
25. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition [Internet]. Vol. 20, *Annual Review of Immunology*. *Annu Rev Immunol*; 2002 [cited 2021 Mar 2]. p. 197–216. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11861602/>
26. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. CAPÍTULO 4 Imunidade Inata. *Imunol Cel e*

- Mol. 2015;1260.
27. Vardon-Boune F, Ruiz S, Gratacap MP, Garcia C, Payrastre B, Minville V. Platelets are critical key players in sepsis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):1–13.
 28. Marín Oyarzún CP, Glembotsky AC, Goette NP, Lev PR, De Luca G, Baroni Pietto MC, et al. Platelet Toll-Like Receptors Mediate Thromboinflammatory Responses in Patients With Essential Thrombocythemia. *Front Immunol.* 2020;11(April):1–12.
 29. Rosas-ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Rosas-Ballina et al - 2011 - Science. *Science (80-).* 2011;334(October):98–102.
 30. Angus DC, Van Der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2013;369(9):840–51.
 31. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, John Wilson TH. *Biologia Molecular da Célula* [Internet]. [cited 2021 Feb 3]. Available from: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=DIMmDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=biologia+molecular+da+célula+&ots=pemB2P1NjY&sig=WvdegoN0FxczROk34S97VhIn-4A#v=onepage&q=biologia+molecular+da+célula&f=false>
 32. Kumar V, Abbas A, Aster JC. *Patologia — Bases Patológicas das Doenças.* 9^a Edição. Elsevier Health Sciences Brazil; 2016.
 33. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, et al. The endothelium in sepsis. *Shock.* 2016;45(3):259–70.
 34. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent-microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32(9):1825–31.
 35. Hallman MR, Treggiari MM, Deem S. Circulatory Shock. *N Engl J Med.* 2013;18(31):1726–60.
 36. 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;19(5):317–23.
 37. Fink M. Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 1997;110:87–95.
 38. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular* [Internet]. 2005 [cited 2020 Sep 2]. p. 576. Available from: <https://www.saraiva.com.br/imunologia-celular-e-molecular-8-ed-2015-com-student-consult-8887801/p>
 39. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255–89.
 40. Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating extracellular vesicles in human disease. *N Engl J Med.* 2018;379(10):958–66.
 41. Van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018;19(4):213–28.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.125>

42. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Jose Alcaraz M, Anderson JD, Jay SM, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines; Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. Anabela Cordeiro-da-Silva [Internet]. 200AD;119. Available from: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
43. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013;2(1).
44. Simonsen JB. What Are We Looking At? Extracellular Vesicles, Lipoproteins, or Both? *Circ Res*. 2017 Sep;121(8):920–2.
45. Choi D-S, Kim D-K, Kim Y-K, Gho YS. PROTEOMICS OF EXTRACELLULAR VESICLES: EXOSOMES AND ECTOSOMES. 2014 [cited 2020 Dec 29]; Available from: <http://evpedia.info>
46. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(2015):1–60.
47. Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ*. 2013;3(2):329–40.
48. Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol* [Internet]. 1967;13(3):269–88. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
49. Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, Dvorak AM, Hahn P, Bitzer AM, et al. Tumor shedding and coagulation. *Science* (80-). 1981;212(4497):923–4.
50. Trams EG, Lauter CJ, Norman Salem J, Heine U. Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *BBA - Biomembr*. 1981;645(1):63–70.
51. Stegmayr B, Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res*. 1982;10(5):253–7.
52. Azuo K, Anno K, Ei S, Asaki S, Ukio Y, Irata H, et al. URINARY EXCRETION OF AQUAPORIN-2 IN PATIENTS WITH DIABETES INSIPIDUS. 1995.
53. Bastida BE, Escolar G, Jamieson GA. Tissue Factor in Microvesicles Shed From U87MG Human Glioblastoma Cells Induces Coagulation, Platelet Aggregation, and Thrombogenesis. *Blood*. 1984;64(1):177–84.
54. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 1983;97(2):329–39.
55. Tlaposo G, Nijman HW, Stoorvogel ~willem, Leijendekker R, Hardingfl Cornelis C, Melief JM, et al. B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles [Internet]. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/183/3/1161/1107814/1161.pdf>

56. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654–9.
57. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles [Internet]. Vol. 14, *Nature Reviews Immunology*. NIH Public Access; 2014 [cited 2020 Dec 29]. p. 195–208. Available from: [/pmc/articles/PMC4350779/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26428100/)
58. Gando S, Levi M, Toh CH. Disseminated intravascular coagulation. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2016;2(Dic):1–16. Available from: [http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.37](https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.37)
59. Raeven P, Zipperle J, Drechsler S. Extracellular vesicles as markers and mediators in sepsis. *Theranostics.* 2018;8(12):3348–65.
60. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: New players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest.* 2004;34(6):392–401.
61. Martínez de Lizarrondo, S., Roncal, C., Calvayrac, O., Rodríguez, C., Varo, N., Purroy, A., Lorente, L., Rodríguez, J. A., Doeuivre, L., Hervás-Stubbs, S., Angles-Cano, E., Páramo, J. A., Martínez-González, J., & Orbe J. Synergistic effect of Thrombin and cd40 ligand on endothelial Matrix Metalloproteinase-10 expression and Microparticle Generation in Vitro and in Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2012;32((6)):1477–87. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.112./248773/-/dc1>.
62. Woth G, Tó M, Füzesi M, Magyarlaci T, Kovács GL, Vermes I, et al. Activated platelet-derived microparticle numbers are elevated in patients with severe fungal (*Candida albicans*) sepsis.
63. Tokés-Füzesi M, Woth G, Ernyey B, Vermes I, Mühl D, Bogár L, et al. Microparticles and acute renal dysfunction in septic patients. *J Crit Care.* 2013;28(2):141–7.
64. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, et al. Circulating Microparticles from Patients with Septic Shock Exert Protective Role in Vascular Function. (9).
65. Forest A, Pautas E, Ray P, Bonnet D, Verny M, Amabile N, et al. Circulating Microparticles and Procoagulant Activity in Elderly Patients. 2010;65(4):414–20.
66. Dalli J, Norling L V, Montero-Melendez T, Canova DF, Lashin H, Pavlov AM, et al. Microparticle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2014 Jan 16 [cited 2021 Mar 17];6(1):27–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/emmm.201303503>
67. Dalli J, Norling L V., Renshaw D, Cooper D, Leung KY, Perretti M. Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood* [Internet]. 2008 Sep 15 [cited 2021 Mar 17];112(6):2512–9. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/112/6/2512/1484030/zh801808002512.pdf>
68. Prakash PS, Caldwell CC, Lentsch AB, Pritts TA, Robinson BRH. Human microparticles generated during sepsis in patients with critical illness are

- neutrophil-derived and modulate the immune response. *J Trauma Acute Care Surg* [Internet]. 2012 Aug [cited 2021 Mar 17];73(2):401–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22846946/>
69. Eriksson M, Nelson D, Nordgren A, Larsson A. Increased platelet microvesicle formation is associated with mortality in a porcine model of endotoxemia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1998;42(5):551–7.
 70. Mortaza S, Martinez MC, Baron-Menguy C, Burban M, De La Bourdonnaye M, Fizanne L, et al. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. *Crit Care Med*. 2009;37(6):2045–50.
 71. Essandoh K, Yang L, Wang X, Huang W, Qin D, Hao J, et al. Blockade of exosome generation with GW4869 dampens the sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2021 Mar 17];1852(11):2362–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26300484/>
 72. Iba T, Ogura H. Role of extracellular vesicles in the development of sepsis-induced coagulopathy. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40560-018-0340-6>
 73. Gambim MH, de Oliveira do Carmo A, Marti L, Veríssimo-Filho S, Lopes LR, Janiszewski M. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: Experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit Care*. 2007 Sep 25;11(5).
 74. Antoniak S. The coagulation system in host defense. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018;2(3):549–57.
 75. Gando S. Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med*. 2010;38(SUPPL. 2).
 76. Levi M, Van Der Poll T. A Short Contemporary History of Disseminated Intravascular Coagulation. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40(8):874–80.
 77. Woei-a-jin FJSH, Starre WE Van Der, Tesselaar MET, Garcia P, Nieuwkoop C Van, Bertina RM, et al. Procoagulant tissue factor activity on microparticles is associated with disease severity and bacteremia in febrile urinary tract infections ☆. *Thromb Res* [Internet]. 2014;133(5):799–803. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.007>
 78. di Villa Bianca E, Jilani Iqbal A, Fredman G, Victoria Norling L, Oggero S, Austin-Williams S. The Contrasting Role of Extracellular Vesicles in Vascular Inflammation and Tissue Repair. 2019; Available from: www.frontiersin.org
 79. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2001;158(2):277–87.
 80. H. Bao, Q-P. Yao, K. Huang, X-H. Chen, Y. Han, Z-L. Jiang, L-Z. Gao Y-XQ. Platelet-derived miR-142-3p induces apoptosis of endothelial cells in hypertension. *Am Biol Teach*. 2003;65(2):148–50.
 81. Janiszewski M, Do Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FRM. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H

- oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Crit Care Med.* 2004 Mar;32(3):818–25.
82. Micheel CM, Nass SJ, Omenn GS, Trials C on the R of O-BT for PPO in C, Services B on HC, Policy B on HS, et al. *Omics-Based Clinical Discovery: Science, Technology, and Applications.* 2012 Mar 23 [cited 2021 Mar 19]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK202165/>
 83. Tsalik EL, Langley RJ, Dinwiddie DL, Miller NA, Yoo B, van Velkinburgh JC, et al. An integrated transcriptome and expressed variant analysis of sepsis survival and death. *Genome Med* [Internet]. 2014 Nov 26 [cited 2021 Mar 23];6(11):1–15. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13073-014-0111-5>
 84. Real JM, Ferreira LRP, Esteves GH, Koyama FC, Dias MVS, Bezerra-Neto JE, et al. Exosomes from patients with septic shock convey miRNAs related to inflammation and cell cycle regulation: new signaling pathways in sepsis? *Crit Care* [Internet]. 2018 Dec 15 [cited 2021 Mar 23];22(1):68. Available from: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-018-2003-3>
 85. Foss EJ, Radulovic D, Shaffer SA, Goodlett DR, Kruglyak L, Bedalov A. Genetic variation shapes protein networks mainly through non-transcriptional mechanisms. *PLoS Biol.* 2011;9(9).
 86. Kraus WL. Editorial: Would You Like A Hypothesis With Those Data? *Omics and the Age of Discovery Science.* Vol. 29, *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.). 2015. p. 1531–4.
 87. May R, Nih ID, Molecular E, Northwest P. Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: biological and technological aspects 1. 2010;4(4):1797–823.
 88. Pathan M, Fonseka P, Chitti S V., Kang T, Sanwlani R, Van Deun J, et al. Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2021 Mar 4];47(D1):D516–9. Available from: <http://www.microvesicles>.
 89. Ogorzalek RR, Hayes R, Yang Y, Hung F, Ramachandran P, Kim N, et al. Top-down , bottom-up , and side-to-side proteomics with virtual 2-D gels. 2005;240:317–25.
 90. Cypryk W, Lorey M, Puustinen A, Nyman TA, Matikainen S. Proteomic and Bioinformatic Characterization of Extracellular Vesicles Released from Human Macrophages upon Influenza A Virus Infection. *J Proteome Res.* 2017;16(1):217–27.
 91. Lorey MB, Rossi K, Eklund KK, Nyman TA, Matikainen S. Global characterization of protein secretion from human macrophages following non-canonical caspase-4/5 inflammasome activation. *Mol Cell Proteomics.* 2017;16(4):S187–99.
 92. Välimäki E, Cypryk W, Virkanen J, Nurmi K, Turunen PM, Eklund KK, et al. Calpain Activity Is Essential for ATP-Driven Unconventional Vesicle-Mediated Protein Secretion and Inflammasome Activation in Human Macrophages. *J Immunol.* 2016;197(8):3315–25.
 93. Cypryk W, Öhman T, Eskelinen EL, Matikainen S, Nyman TA. Quantitative

- proteomics of extracellular vesicles released from human monocyte-derived macrophages upon β -glucan stimulation. *J Proteome Res*. 2014;13(5):2468–77.
94. Morris DC, Jaehne AK, Chopp M, Zhang Z, Poisson L, Chen Y, et al. Proteomic Profiles of Exosomes of Septic Patients Presenting to the Emergency Department Compared to Healthy Controls. *J Clin Med*. 2020;9(9):2930.
 95. Ludwig KR, Hummon AB. Mass spectrometry for the discovery of biomarkers of sepsis. *Mol Biosyst*. 2017 Mar;13(4):648–64.
 96. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(11):845–67.
 97. Chengjian Tu, Paul A. Rudnick, Misti Y. Martinez, Kristin L. Cheek, Stephen E. Stein, Robbert J. C. Slebos and DCL. Depletion of Abundant Plasma Proteins and Limitations of Plasma Proteomics. *J Proteome Res* [Internet]. 2010;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 98. Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*. 2013;13(10–11):1554–71.
 99. Kraus WL. Editorial : Would You Like A Hypothesis With Those Data ? *Omics and the Age of Discovery Science*. 2016;29(November 2015):1531–4.
 100. Redgrave TG, Roberts DCK, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem*. 1975;65(1–2):42–9.
 101. Brogan PA, Shah V, Brachet C, Harnden A, Mant D, Klein N, et al. Endothelial and Platelet Microparticles in Vasculitis of the Young. *ARTHRITIS Rheum*. 2004;50(3):927–36.
 102. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 23;113(8):E968–77.
 103. Böing AN, Pol E Van Der, Grootemaat AE, Frank AW, Sturk A, Nieuwland R, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. 2014;3078.
 104. Gaspar LS, Santana MM, Henriques C, Pinto MM, Ribeiro-Rodrigues TM, Girão H, et al. Simple and Fast SEC-Based Protocol to Isolate Human Plasma-Derived Extracellular Vesicles for Transcriptional Research. *Mol Ther - Methods Clin Dev* [Internet]. 2020 Sep 11 [cited 2021 Jan 15];18:723–37. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.07.012>.
 105. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2011;7(6):780–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>
 106. Instruments M. NANOSIGHT NS300 OPERATING MANUAL Contents. 2015.
 107. Gundry RL, White MY, Murray CI, Lesley A, Fu Q, Stanley BA, et al. Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomics Workflow. 2009;(October):1–23.

108. Ruderman D. Chapter 19 Designing Successful Proteomics Experiments. 2017;1550.
109. Eliuk S, Makarov A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation.
110. Yates JR, Ruse CI. Proteomics by Mass Spectrometry : Approaches , Advances , and Applications. :49–80.
111. Käll L, Storey JD, MacCoss MJ, Noble WS. Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases. *J Proteome Res*. 2008;7(1):29–34.
112. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost F V, Santos MDM, Fischer JSG, Aquino PF, et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4 . 0. *Nat Protoc [Internet]*. 2015;11(01):102–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.133>
113. Carvalho PC, Hewel J, Barbosa VC, Yates JR. Identifying differences in protein expression levels by spectral counting and feature selection. *Genet Mol Res*. 2008;7(2):342–56.
114. Pundir S, Martin MJ, O'Donovan C. UniProt Tools. *Curr Protoc Bioinforma*. 2016 Mar;53:1.29.1-1.29.15.
115. Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, Gangoda L, Quek CYJ, Williamson NA, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics [Internet]*. 2015 Aug 1 [cited 2021 Jan 15];15(15):2597–601. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pmic.201400515>
116. Pathan M, Fonseka P, Chitti S V., Kang T, Sanwlani R, Van Deun J, et al. Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2019 Jan 8 [cited 2021 Jan 15];47(D1):D516–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30395310/>
117. Croft D, O'Kelly G, Wu G, Haw R, Gillespie M, Matthews L, et al. Reactome: A database of reactions, pathways and biological processes. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(SUPPL. 1):691–7.
118. Zhou G, Soufan O, Ewald J, Hancock REW, Basu N, Xia J. NetworkAnalyst 3.0: A visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W234–41.
119. 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 [Internet]*. 2003 Nov [cited 2021 Jan 15];13(11):2498–504. Available from: </pmc/articles/PMC403769/?report=abstract>
120. Doncheva NT, Morris JH, Gorodkin J, Jensen LJ. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. *J Proteome Res [Internet]*. 2019 Feb 1 [cited 2021 Jan 16];18(2):623–32. Available from: </pmc/articles/PMC6800166/?report=abstract>
121. Gonçalves ANA, Lever M, Russo PST, Gomes-Correia B, Urbanski AH, Pollara G, et al. Assessing the impact of sample heterogeneity on transcriptome analysis of human diseases using mdp webtool. *Front Genet*. 2019;10(OCT).

122. Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016;44:147–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/034694>
123. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2002;1(11):845–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.R200007-MCP200>
124. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles*. 2014;3(1).
125. Alaupovic P. Significance of apolipoproteins for structure, function, and classification of plasma lipoproteins. *Methods Enzymol*. 1996;263:32–60.
126. Devaraj S, Semaan JR, Jialal I. Biochemistry, Apolipoprotein B. In *Treasure Island (FL)*; 2021.
127. Vorchheimer DA, Becker R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(1):59–68.
128. Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal*. 2004;16(12):1329–44.
129. Aslan JE, Mccarty OJT. Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost*. 2013;11(1):35–46.
130. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):403–13.
131. Brown K, Brain S, Pearson J, Edgeworth J, Lewis S, Treacher D. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*. 2006;368(9530):157–69.
132. Martin-Fernandez M, Vaquero-Roncero LM, Almansa R, Gómez-Sánchez E, Martín S, Tamayo E, et al. Endothelial dysfunction is an early indicator of sepsis and neutrophil degranulation of septic shock in surgical patients. *BJS open* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 May 26];4(3):524–34. Available from: www.bjsopen.com
133. Kreimer S, Ivanov AR. Rapid Isolation of Extracellular Vesicles from Blood Plasma with Size-Exclusion Chromatography Followed by Mass Spectrometry-Based Proteomic Profiling. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2017;1660:295–302. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28828666>
134. Brennan K, Martin K, Fitzgerald SP, Sullivan JO, Wu Y, Blanco A, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. 2020;1–13.
135. Mingrui An, Jing Wu, Jianhui Zhu and DML. Comparison of an Optimized Ultracentrifugation Method versus Size-Exclusion Chromatography for Isolation of Exosomes from Human Serum Mingrui. *J Proteome Res*. 2019;17(10):3599–605.
136. Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):1–19.
137. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical

- analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(4). Available from: www.nature.com/scientificreports
138. Linares R, Tan S, Gounou C, Arraud N, Brisson AR. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(1):1–7.
 139. Reiner AT, Witwer KW, Van Balkom BWM, De Beer J, Brodie C, Corteling RL, et al. Concise Review: Developing Best-Practice Models for the Therapeutic Use of Extracellular Vesicles SIGNIFICANCE STATEMENT. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2017;6:1730–9. Available from: <http://dx.doi.org/>
 140. Nordin JZ, D M, Lee Y, Vader P, Mäger I, Johansson HJ, et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2015;11(4):879–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.01.003>
 141. Li J, He X, Deng Y, Yang C. An Update on Isolation Methods for Proteomic Studies of Extracellular Vesicles in Biofluids. 2019;1–20.
 142. Abramowicz A, Widlak P, Pietrowska M. Molecular BioSystems Proteomic analysis of exosomal cargo : the challenge of high purity vesicle isolation. *Mol Biosyst* [Internet]. 2016;17–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C6MB00082G>
 143. Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles : Determining the correct approach (Review). 2015;
 144. Hortin GL, Sviridov D. The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome. *J Proteomics* [Internet]. 2010;73(3):629–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.07.001>
 145. He XL, Liao XL, Xie ZC, Han L, Yang XL, Kang Y. Pulmonary Infection Is an Independent Risk Factor for Long-Term Mortality and Quality of Life for Sepsis Patients. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
 146. Montecino-Rodriguez E, Berent-Maoz B, Dorshkind K. Causes, consequences, and reversal of immune system aging. *J Clin Invest*. 2013;123(3):958–65.
 147. Kuravi SJ, Yates CM, Foster M, Harrison P, Hazeldine J, Hampson P, et al. Changes in the pattern of plasma extracellular vesicles after severe trauma. *PLoS One*. 2017 Aug 1;12(8).
 148. Chen H-P, Wang X-Y, Pan X-Y, Hu W-W, Cai S-T, Joshi K, et al. Circulating Neutrophil-Derived Microparticles Associated with the Prognosis of Patients with Sepsis. 2020; Available from: <http://doi.org/10.2147/JIR.S287256>
 149. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FPHTM, Westendorp RGJ, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):930–5.
 150. Im Y, Yoo H, Lee JY, Park J, Suh GY, Jeon K. Association of plasma exosomes with severity of organ failure and mortality in patients with sepsis. *J Cell Mol Med*. 2020;24(16):9439–45.
 151. Boscolo A, Campello E, Bertini D, Spiezia L, Lucchetta V, Piasentini E, et al. Levels of circulating microparticles in septic shock and sepsis-related complications: A case-control study. *Minerva Anesthesiol*. 2019;85(6):625–34.

152. Chao J, Guo Y, Chao L. Protective role of endogenous kallistatin in vascular injury and senescence by inhibiting oxidative stress and inflammation. Vol. 2018, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2018.
153. Stoppelaar. The role of platelets in sepsis. *Res Pract Thromb Haemost*. 2020;1(12):666–77.
154. Kerris EWJ, Hoptay C, Calderon T, Freishtat RJ. Platelets and platelet extracellular vesicles in hemostasis and sepsis [Internet]. Vol. 68, *Journal of Investigative Medicine*. 2020. p. 813–20. Available from: <http://jim.bmj.com/>
155. Levi M, Van Der Poll T. Endothelial injury in sepsis. *Intensive Care Med* [Internet]. 2013 Oct 8 [cited 2021 Feb 24];39(10):1839–42. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00134-013-3054-1>
156. Buzás EI, Tóth E, Sódar BW, Szabó-Taylor K. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles [Internet]. Vol. 40, *Seminars in Immunopathology*. Springer Verlag; 2018 [cited 2021 Feb 27]. p. 453–64. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0682-0>
157. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin A V, Panteleev MA, Krymskaya O V, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost*. 2007 Mar;97(3):425–34.
158. Terrisse AD, Puech N, Allart S, Gourdy P, Xuereb JM, Payrastre B, et al. Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow. *J Thromb Haemost*. 2010;8(12):2810–9.
159. Corken A, Russell S, Dent J, Post SR, Ware J. Platelet glycoprotein Ib-IX as a regulator of systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(5):996–1001.
160. Pitchford S, Pan D, Welch HCE. Platelets in neutrophil recruitment to sites of inflammation [Internet]. Vol. 24, *Current Opinion in Hematology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017 [cited 2021 Mar 3]. p. 23–31. Available from: </pmc/articles/PMC5421649/>
161. Kerris EWJ, Hoptay C, Calderon T, Freishtat RJ. Platelets and platelet extracellular vesicles in hemostasis and sepsis [Internet]. Vol. 68, *Journal of Investigative Medicine*. BMJ Publishing Group; 2020 [cited 2021 Feb 26]. p. 813–20. Available from: <http://jim.bmj.com/>
162. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med*. 2007;13(4):463–9.
163. Delabranche X, Quenot J, Lavigne T, Mercier E, Mehdi M, Zobairi F, et al. Early Detection of Disseminated Intravascular Coagulation During Septic Shock: A Multicenter Prospective Study. 2016;44(10).
164. Dalli J, Montero-Melendez T, Norling L V., Yin X, Hinds C, Haskard D, et al. Heterogeneity in neutrophil microparticles reveals distinct proteome and functional properties. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Feb 25];12(8):2205–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23660474/>
165. Manchanda K, Kolarova H, Kerkenpaß C, Mollenhauer M, Vitecek J, Rudolph

- V, et al. MPO (myeloperoxidase) reduces endothelial glycocalyx thickness dependent on its cationic charge. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2018 [cited 2021 Feb 25];38(8):1859–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29903730/>
166. Iacoviello L, Kolpakov V, Salvatore L, Amore C, Pintucci G, De Gaetano G, et al. Human Endothelial Cell Damage by Neutrophil-Derived Cathepsin G: Role of Cytoskeleton Rearrangement and Matrix-Bound Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(11):2037–46.
 167. Boyman O, Murai T, Yuan SY, Jr BR, Ma Y, Yang X, et al. Role of Neutrophil Extracellular Traps and Vesicles in Regulating Vascular Endothelial Permeability. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10:1037. Available from: www.frontiersin.org
 168. Schenk BI, Petersen F, Flad H-D, Brandt E. Platelet-Derived Chemokines CXC Chemokine Ligand (CXCL)7, Connective Tissue-Activating Peptide III, and CXCL4 Differentially Affect and Cross-Regulate Neutrophil Adhesion and Transendothelial Migration. *J Immunol* [Internet]. 2002 Sep 1 [cited 2021 Feb 25];169(5):2602–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12193731/>
 169. SARABI A, KRAMP BK, DRECHSLER M, HACKENG TM, SOEHNLEIN O, WEBER C, et al. CXCL4L1 inhibits angiogenesis and induces undirected endothelial cell migration without affecting endothelial cell proliferation and monocyte recruitment. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2021 Feb 27];9(1):209–19. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2010.04119.x>
 170. Gouwy M, Ruytinx P, Radice E, Claudi F, Van Raemdonck K, Bonecchi R, et al. CXCL4 and CXCL4L1 differentially affect monocyte survival and dendritic cell differentiation and phagocytosis. *PLoS One* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2021 Feb 27];11(11). Available from: [/pmc/articles/PMC5102431/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111111/)
 171. Jin ZG, Lungu AO, Xie L, Wang M, Wong C, Berk BC. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2004 Jul [cited 2021 Feb 27];24(7):1186–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15130913/>
 172. Xie Y, Li X, Ge J. Cyclophilin A–FoxO1 signaling pathway in endothelial cell apoptosis. *Cell Signal* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 Feb 27];61:57–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31063815/>
 173. Yin W, Ghebrehiwet B, Peerschke EIB. Expression of complement components and inhibitors on platelet microparticles. *Platelets* [Internet]. 2008 May [cited 2021 Feb 27];19(3):225–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18432523/>
 174. Miki H, Suetsugu S, Takenawa T. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J* [Internet]. 1998 Dec 1 [cited 2021 Feb 24];17(23):6932–41. Available from: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/17.23.6932>
 175. Johnson SM, Dempsey C, Parker C, Mironov A, Bradley H, Saha V. Acute lymphoblastic leukaemia cells produce large extracellular vesicles containing organelles and an active cytoskeleton. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2017;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/20013078.2017.1294339>

176. Schlegel N, Waschke J. Vasodilator-stimulated phosphoprotein: crucial for activation of Rac1 in endothelial barrier maintenance. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2021 Feb 24];87(1):1–3. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1093/cvr/cvq093>
177. Bogatcheva N V., Zemskova MA, Kovalenkov Y, Poirier C, Verin AD. Molecular mechanisms mediating protective effect of cAMP on lipopolysaccharide (LPS)-induced human lung microvascular endothelial cells (HLMVEC) hyperpermeability. *J Cell Physiol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2021 Feb 24];221(3):750–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19725051/>
178. Sung BH, Parent CA, Weaver AM. Extracellular vesicles: Critical players during cell migration. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.020>
179. Fujimi S, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Hosotsubo H, Nakamori Y, et al. Activated polymorphonuclear leukocytes enhance production of leukocyte microparticles with increased adhesion molecules in patients with sepsis. *J Trauma*. 2002;52(3):443–8.
180. Barry OP, Praticò D, Savani RC, Fitzgerald GA. Modulation of Monocyte-Endothelial Cell Interactions by Platelet Microparticles [Internet]. Vol. 102, *J. Clin. Invest*. 1998. Available from: <http://www.jci.org>
181. Kuravi SJ, Harrison P, Rainger GE, Nash GB. Ability of Platelet-Derived Extracellular Vesicles to Promote Neutrophil-Endothelial Cell Interactions. *Inflammation*. 2019;42(1):290–305.
182. Zonneveld R, Martinelli R, Shapiro NI, Kuijpers TW, Plötz FB, Carman C V. Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Crit Care*. 2014;18(1):1–14.
183. Amalakuhan B, Habib SA, Mangat M, Reyes LF, Rodriguez AH, Hinojosa CA, et al. Endothelial adhesion molecules and multiple organ failure in patients with severe sepsis. *Cytokine* [Internet]. 2016 Dec 1 [cited 2021 Jun 4];88:267–73. Available from: </pmc/articles/PMC5121929/>
184. Schaff M, Tang CJ, Maurer E, Bourdon C, Receveur N, Eckly A, et al. Integrin $\alpha 6 \beta 1$ is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation* [Internet]. 2013 Jul 30 [cited 2021 May 25];128(5):541–52. Available from: <http://circ.ahajournals.org>
185. French KC, Antonyak MA, Cerione RA. Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake [Internet]. Vol. 67, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2017 [cited 2021 Feb 26]. p. 48–55. Available from: </pmc/articles/PMC5484727/>
186. Sung BH, Ketova T, Hoshino D, Zijlstra A, Weaver AM. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat Commun* [Internet]. 2015 May 13 [cited 2021 Feb 27];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25968605/>
187. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. *Dev Cell* [Internet]. 2009;16(2):209–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.004>

188. Kondo N, Ogawa M, Wada H, Nishikawa SI. Thrombin induces rapid disassembly of claudin-5 from the tight junction of endothelial cells. *Exp Cell Res* [Internet]. 2009;315(17):2879–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.07.031>
189. Ozaki H, Ishii K, Horiuchi H, Arai H, Kawamoto T, Okawa K, et al. Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *J Immunol* [Internet]. 1999;163(2):553–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395639>
190. Azari BM, Marmur JD, Salifu MO, Ehrlich YH, Kornecki E, Babinska A. Transcription and translation of human F11R gene are required for an initial step of atherogenesis induced by inflammatory cytokines. *J Transl Med* [Internet]. 2011 Jun 26 [cited 2021 Mar 5];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21703019/>
191. Corada M, Chimenti S, Cera MR, Vinci M, Salio M, Fiordaliso F, et al. Junctional adhesion molecule-A-deficient polymorphonuclear cells show reduced diapedesis in peritonitis and heart ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 26;102(30):10634–9.
192. Watson RL, Buck J, Levin LR, Winger RC, Wang J, Arase H, et al. Endothelial CD99 signals through soluble adenylyl cyclase and PKA to regulate leukocyte transendothelial migration. *J Exp Med* [Internet]. 2015 Jun 29 [cited 2021 Mar 5];212(7):1021–41. Available from: </pmc/articles/PMC4493416/>
193. Ford ML, Onami TM, Sperling AI, Ahmed R, Evavold BD. CD43 Modulates Severity and Onset of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2021 Mar 5];171(12):6527–33. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/171/12/6527><http://www.jimmunol.org/content/171/12/6527.full#ref-list-1>
194. Tsuneki M, Madri JA. CD44 regulation of endothelial cell proliferation and apoptosis via modulation of CD31 and VE-cadherin expression. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 Feb 28 [cited 2021 Mar 5];289(9):5357–70. Available from: </pmc/articles/PMC3937614/>
195. Gao S, Zhu H, Zuo X, Luo H. Cathepsin g and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch Rheumatol*. 2018;33(4):748–9.
196. Alarcón-Vila C, Baroja-Mazo A, de Torre-Minguela C, Martínez CM, Martínez-García JJ, Martínez-Banaclocha H, et al. Cd14 release induced by p2x7 receptor restricts inflammation and increases survival during sepsis. *Elife* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Mar 5];9:1–21. Available from: </pmc/articles/PMC7690950/>
197. Mauro C, Brancaleone V, Mullen L, Purvis GSD, Solito E, Thiemermann C. Annexin-A1: Therapeutic Potential in Microvascular Disease. *Front Immunol* | www.frontiersin.org [Internet]. 1980;1:938. Available from: www.frontiersin.org
198. Gobbetti T, Coldewey SM, Chen J, McArthur S, Le Faouder P, Cenac N, et al. Nonredundant protective properties of FPR2/ALX in polymicrobial murine sepsis. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1410938111
199. Sudlow AW, Carey F, Forder R, Rothwell NJ. The role of lipocortin-1 in dexamethasone-induced suppression of PGE2 and TNF α release from human peripheral blood mononuclear cells.

200. Leoni G, Nusrat A. Annexin A1: Shifting the balance towards resolution and repair.
201. Getting SJ, Flower RJ, Perretti M. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. 1997.
202. Zhang L, Zheng Y, Hu R, Zhu L, Hu C, Cheng F, et al. Annexin A1 Mimetic Peptide AC2-26 Inhibits Sepsis-induced Cardiomyocyte Apoptosis through LXA4/PI3K/AKT Signaling Pathway. *Curr Med Sci* [Internet]. 2018;38(6):997–1004. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11596-018-1975-1>
203. Xu Y, Ku X, Wu C, Cai C, Tang J, Yan W. Exosomal proteome analysis of human plasma to monitor sepsis progression. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2018;499(4):856–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.006>

ANEXOS

ANEXO I - CEP – CAAE 19752613.9.1001.5249

HOSPITAL COPA DOR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SAE Study - Avaliação da disfunção cerebral em pacientes com sepse grave: Estudo observacional

Pesquisador: Fernando Augusto Bozza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19752613.9.1001.5249

Instituição Proponente: INSTITUTO D'OR DE PESQUISA E ENSINO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 521.030

Data da Relatoria: 10/12/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma modificação de um projeto já aprovado pelo CEP em setembro de 2013 (parecer:404.802) no qual os autores solicitam autorização de um estudo piloto com 20 pacientes antes da execução do projeto maior.

Não houve mudanças nas características dos pacientes ou no desenvolvimento do estudo.

Estudo piloto aprovado em reunião ordinária do CEP em 16 de janeiro de 2014

Objetivo da Pesquisa:

vide parecer numero 404.802 de 24 set. de 2013

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

vide parecer numero 404.802 de 24 set. de 2013

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

vide parecer numero 404.802 de 24 set. de 2013

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

vide parecer numero 404.802 de 24 set. de 2013

Endereço: Rua Figueiredo Magalhães, 875

Bairro: Copacabana

CEP: 22.031-010

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2545-3792

Fax: (21)2548-6610

E-mail: cepcopador@copador.com.br

ANEXO II - Termo de Consentimento LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: Adaptações Metabólicas na Sepse: Mecanismos Fisiopatológicos e Impacto Sobre Desfechos Clínicos

Título do Projeto: Análise Proteômica De Vesículas Extracelulares Isoladas Do Plasma De Pacientes Com Sepse.

Justificativa e objetivos

Durante as infecções graves, nosso organismo reage de forma a combater os micro-organismos. 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 até 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 ao 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 -80 °C ou tanque de nitrogênio líquido de acordo com procedimento operacional pré-definido nos Laboratórios de Toxinologia e 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 Dra. Monique Trugilho ou Dr. Fernando Bozza nos telefones 2562-1242 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 (doador saudável)

Data

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

Assinatura (membro da equipe de pesquisa)

Data

ANEXO III - INFORMAÇÕES DE BASE PARA COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO DE VOLUNTÁRIOS SAUDÁVEIS.

- Idade
- Sexo
- Etnia
- Mulheres: Gravidez recente, grávida, ciclo menstrual ou em estado de menopausa?
- Hospitalização recente?
- Algum tratamento com anticoagulante prévio, atual ou coagulopatias?
- Terapia com heparina? Heparinóides? Aspirinas?
- Caso de embolia pulmonar?
- Medicação regular?
- Fumante?
- Drogas de abuso?
- Atividade física semanal?
- Trabalho de rotina ou trabalho em casa?
- Atividade física semanal maior ou menor que 3h?
- Sono regular? (ex. Trabalho noturno ou algum distúrbio do sono?).
- Última refeição sólida ou líquida antes da coleta.

Detalhes adicionais.