

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – USP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**O papel de neutrófilos PD-L1+ durante
a hiperinflamação nas doenças hepáticas
gordurosas não alcoólicas**

CLEYSON DA CRUZ OLIVEIRA BARROS

Ribeirão Preto

2024

CLEYSON DA CRUZ OLIVEIRA BARROS

Versão Corrigida

**O papel de neutrófilos PD-L1+ durante
a hiperinflamação nas doenças hepáticas
gordurosas não alcoólicas**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Ribeirão Preto

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial do trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a

Oliveira-Barros, Cleyson da Cruz

O papel de neutrófilos PD-L1⁺ durante a hiperinflamação nas doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas, 2024

98p

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Fernando de Queiroz Cunha

Palavras-chave: neutrófilo; DHGNA; sepse; PD-L1.

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor, Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro de CAPES, CNPq e FAPESP.

Nome: Cleyson da Cruz Oliveira Barros

Título: O papel de neutrófilos PD-L1⁺ durante a hiperinflamação nas doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Doutor em Ciência.

Área de concentração: Imunologia

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Alexandre Alarcon Steiner

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

Instituição Universidade Federal do Rio de Janeiro

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Quando te jogarem pedras, atire flores.

Pedras acumuladas formam muralhas.

Flores deixam perfume e sementes!

Edmasfcosta

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, primeiramente, minha mãe Adalci Ana da Cruz, guerreira, meu espelho, meu pai, Clevson Oliveira Barros, por todo suporte e apoio durante todos esses anos de vida. Além disso, dedico ao meu irmão, Jadson, por todo apoio, conversas e carinho! Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, profissional que me auxiliou durante a construção do meu pensamento científico durante o doutoramento. Obrigado por me dar a liberdade e criatividade para criar e dar origem a esse trabalho lindo.

Aos demais professores do laboratório de Inflamação e Dor, Prof. José Carlos Alves filho e prof. Thiago Mattar Cunha, pelas contribuições científicas e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico.

Aos meus pais Adalci e Clevson, e meu irmão Jadson, pelo amor e carinho incondicional, pelos ensinamentos que me definiram a ser a pessoa que sou hoje. Obrigado por serem meu ponto de apoio em momentos difíceis, mudanças e vitórias.

Aos colegas do laboratório de Inflamação e Dor, um laboratório que é uma escola em que tiramos muitos aprendizados. Um laboratório fenomenal, pois sempre tive apoio científico, metodológico quando precisei. Agradeço pelas discussões científicas sobre esse trabalho, momentos de diálogo e aprendizado, e também pelos momentos de descontrações.

Aos técnicos Serginho, Diva e Ieda, pela amizade suporte, carinho e disponibilidade. A Marcela, obrigado por ser essa profissional que nos oferece do bom e do melhor, sempre disposta a ajudar e auxiliar os alunos. Gostaria de agradecer a Katinha, por todas as conversas, amizade, suporte, conselhos e ajudas quando precisei. Vocês são pessoas maravilhosas, vou sentir saudades! Ainda, à Denise, pelo apoio durante o processo de construção nesse trabalho me auxiliando nas citometrias, ensinamentos operacionais. À Ana Cristine, pelo auxílio burocrático, pelas conversas, amizade e todo suporte necessário, muito obrigado!

Agradeço aos meus amigos mais próximos Jheferson, Italo, Diego, Samuel, Lais, Carol, Alexandre Kanashiro pelas conversas durante esses longos anos do meu doutorado, foram anos incríveis ao lado de vocês. Com toda certeza, os dias foram melhores com vocês, obrigado por essa amizade construída, gratidão.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Center for Research in Inflammatory Disease (CRID) pelo apoio financeiro fundamental para desenvolvimento deste trabalho e concessão de bolsa de estudo.

RESUMO

Cleyson da Cruz Oliveira Barros. O papel de neutrófilos PD-L1⁺ durante a hiperinflamação nas doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas. 2024. (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2024

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma condição patológica que afeta muitas pessoas em todo o mundo. Pacientes com DHGNA são mais suscetíveis a respostas inflamatórias sistêmicas, incluindo sepse, que é acompanhada por danos progressivos e graves no fígado. No entanto, os mecanismos imunológicos que regulam as respostas hiperinflamatórias na DHGNA permanecem desconhecidos. No presente estudo, relatamos que camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura e deficiente em colina a curto prazo, que não apresentaram sinais de danos hepáticos e inflamação, são mais suscetíveis a uma inflamação sistêmica moderada semelhante à sepse induzida pelo desafio com LPS devido a uma resposta imune específica do fígado. Mecanicamente, os camundongos endotoxêmicos mostram uma produção excessiva de IFN γ pelas células NK hepáticas que provoca níveis elevados de TNF α por uma subpopulação específica de neutrófilos expressando PD-L1, exacerbando os danos hepáticos e a mortalidade. Notavelmente, o bloqueio farmacológico de PD-L1 regulou o recrutamento de neutrófilos para o fígado e a produção de TNF α , prevenindo os danos hepáticos e a gravidade da expectativa de vida do hospedeiro. Nosso estudo nos permite descrever a DHGNA como um novo fator de risco para agravamento da sepse e também sugere novas abordagens terapêuticas para desenvolver estratégias eficazes para controlar as respostas hiperinflamatórias nessas condições metabólicas e melhorar os resultados para os pacientes.

Palavras-chave: neutrófilo; DHGNA; sepse; PD-L1.

ABSTRACT

Cleyson da Cruz Oliveira Barros. The Role of Neutrophils PD-L1⁺ during hiperInflammation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. 2024. (PhD in Basic and Applied Immunology) – Ribeirão Preto Medical School, 2024

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a pathological condition affecting many individuals worldwide. Patients with NAFLD are more susceptible to systemic inflammatory responses, including sepsis, which is accompanied by a progressive and severe liver damage. However, the immunological mechanisms that regulate the hyper-inflammatory responses in NAFLD remains unknown. In the present study, we reported that short-term HFCD (Choline Deficient High Fat Diet)-fed mice, which showed no signs of hepatic damage and inflammation, are more susceptible to a moderate sepsis-like systemic inflammation induced by LPS challenge due to a liver-specific immune response. Mechanistically, the endotoxemic mice show an excessive hepatic NK-producing IFN γ production that provokes high TNF α levels by a specific sub-population of PD-L1 expressing neutrophils, exacerbating the liver damage and mortality. Notably, the pharmacological blockage of PD-L1 regulated the massive liver recruitment of neutrophils and TNF α production, preventing the hepatic damage and the severity of the host lifespan. Our study allows us to describe NAFLD as a new risk factor of sepsis aggravation and also suggests novel therapeutic avenues to design effective strategies to control hyperinflammatory responses in these metabolic conditions and improve outcomes for patients

Key Words: neutrophil; NAFLD; sepsis; PDL-1.

INDICE

DEDICÁTÓRIA.....	7
AGRADECIMENTOS.....	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	x
1.INTRODUÇÃO.....	20
1.1 EPIDEMIOLOGIA E CARACTÉRISTICAS GERAIS DA DOENÇAS HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA.....	19
1.2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA DHGNA.....	22
1.3 A PARTICIPAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS DURANTE A DHGNA.....	23
1.4 A PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS T E NK DURANTE DGHNA.....	24
1.5 DGNA E INFECÇÕES.....	24
1.6 SEPSE.....	24
1.7 A PARTICIPAÇÃO DAS CELULAS NK DURANTE A SEPSE.....	27
1.8 NEUTRÓFILOS E SEU PAPEL NA SEPSE.....	29
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34

3.1 ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO.....	34
3.2 INDUÇÃO DA ENDOTOXEMIA.....	34
3.3 COLETA DE PLASMA.....	35
3.4 COLETA DE ORGÃOS.....	35
3.5 CITOMETRIA.....	36
3.6 CONCENTRAÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS.....	37
3.7 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS MURINOS.....	38
3.8 DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS	38
3.9 DEPLEÇÃO DE CÉLULAS NK	39
3.10 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE RNA DE CÉLULA ÚNICA.....	39
3.11 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO.....	40
3.12 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS.....	40
3.13 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FIGADO.....	41
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4 RESULTADOS.....	42
4.1 A ESTEATOSE HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA EXACERBA A PRODUÇÃO DE IFN-GAMMA E TNF-ALPHA , PROMOVENDO MAIOR SUSCETIBILIDADE À INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS.....	42
4.2 A ESTEATOSE HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA INDUZ O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS NK QUE SÃO FONTES DE IFN-GAMMA NA ENDOTOXEMIA.....	49
4.3 NEUTRÓFILOS SÃO RESPONSÁVEIS PELA SUSCETIBILIDADE DURANTE A HIPERINFLAMAÇÃO NA DHGNA.....	53
4.4 IFN-GAMMA INDUZ A EXPRESSÃO DE PD-L1 EM NEUTROFILOS DURANTE DHGNA.....	58

4.5 NEUTRÓFILOS EXPRESSAM PD-L1 E SECRETAM TNF-ALPHA DURANTE A HIPERINFLAMAÇÃO NA DHGNA.....	62
4.6 O TRATAMENTO COM ANTI-PD-L1 PROTEGE ANIMAIS COM NAFLD DURANTE HIPERINFLAMAÇÃO.....	66
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÃO.....	76
7. REFERENCIAS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estados Imuno-inflamatórios durante a sepse.....	21
Figura 2 – Epidemiologia Global das doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas.....	27
Figura 3 – Estratégia de Gated utilizada para fenotipagem celular.....	36
Figura 4 – A expressão de genes das vias inflamatórias <i>IFNγ</i> e <i>TNFα</i> é aumentada durante o desenvolvimento da DHGNA em humanos.....	42
Figura 5 - <i>IFNγ</i> , <i>TNFα</i> e <i>CD274</i> são up-regulados em células recrutadas para o ambiente hepático durante o desenvolvimento da DHGNA em camundongos.....	43
Figura 6 - Camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura e deficiente em colina (HFCD) desenvolvem DHGNA e são mais suscetíveis à endotoxemia.....	45
Figura 7- Animais com DHGNA possuem exacerbação de <i>IFNγ</i> e <i>TNFα</i> durante a endotoxemia.....	46
Figura 8 - <i>TNF-α</i> e <i>IFN-γ</i> participam da susceptibilidade em camundongos com DHGNA à endotoxemia.....	47
Figura 9- Células T não participam na susceptibilidade durante a endotoxemia na DHGNA.....	48
Figura 10- Células NK são grandes fontes produtoras de IFN e participam da susceptibilidade durante a endotoxemia na DHGNA.....	50
Figura 11- Monócitos e neutrófilos são recrutados durante a endotoxemia na DHGNA.....	51
Figura 12 - Os monócitos não participam da susceptibilidade em camundongos com NAFLD à endotoxemia.....	52
Figura 13- Neutrófilos mediam a susceptibilidade de animais com DHGNA à endotoxemia.....	57
Figura 14- Neutrófilos expressam PD-L1 durante endotoxemia na DHGNA.....	53
Figura 15 O <i>IFN-γ</i> induz a expressão de PD-L1 e reduz a apoptose em neutrófilos de camundongos com DHGNA.....	56
Figura 16 A expressão de PD-L1 em neutrófilos ocorre no fígado e não nos pulmões em animais com DHGNA durante a endotoxemia.....	57
Figura 17- A secreção dependente de <i>IFN-γ</i> de <i>TNF-α</i> por neutrófilos PD-L1+ induz a susceptibilidade de animais com DHGNA à endotoxemia.....	59
Figura 18- Os animais <i>TNFR1/R2</i> -/- não apresentam redução na infiltração de neutrófilos no tecido hepático de animais com DHGNA.....	60

Figura 19- O tratamento com anti PD-L1 reduz os neutrófilos PD-L1 em animais com DHGNA durante a endotoxemia.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHGNA: Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

EHNA: esteato-hepatite não alcoólica

IFN- γ : Interferon-gamma

IL-1: Interleucina-1

IL-6: Interleucina-6

IL-2: Interleucina-2

IL-18: Interleucina-18

IL-33: Interleucina-33

CXCL1: CXC motif chemokine ligant 1

CXCL2: CXC motif chemoine ligant 2

LPS: Lipopolissacarídeo

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral-alpha

TIGIT: Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM

TLR: Receptor do tipo toll

PD-1: Proteína de Morte Programada-1

PD-L1: Proteína de Morte Programada Ligante-1

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PBS: Salina tamponada com fosfato

PRRs: Receptores de reconhecimento padrão

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma condição crônica que se caracteriza pelo acúmulo excessivo de gordura no fígado em pessoas que não consomem quantidades significativas de álcool (RINELLA, 2015). Esta característica a diferencia de outras formas de doenças hepáticas gordurosas, como a esteatose hepática alcoólica (CHALASANI *et al.*, 2018). A DHGNA é considerada a principal causa de doença hepática crônica em muitos países e abrange um espectro de doenças que vão desde a esteatose hepática simples (EH) até a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), podendo causar implicações significativas para a saúde, uma vez que pode progredir para cirrose hepática, câncer de fígado, e outras complicações graves (VERNON; BARANOVA; YOUNOSSI, 2011).

A DHGNA tem se tornado uma preocupação crescente em todo o mundo, com uma prevalência estimada de cerca de 25% da população mundial (YOUNOSSI *et al.*, 2018). O crescimento alarmante da obesidade e do sedentarismo tem sido apontado como um dos principais fatores para o aumento dessa condição (CHALASANI *et al.*, 2018). Além disso, a DHGNA está intimamente relacionada a fatores metabólicos, como resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e síndrome metabólica (RINELLA, 2015; TILG; MOSCHEN, 2010).

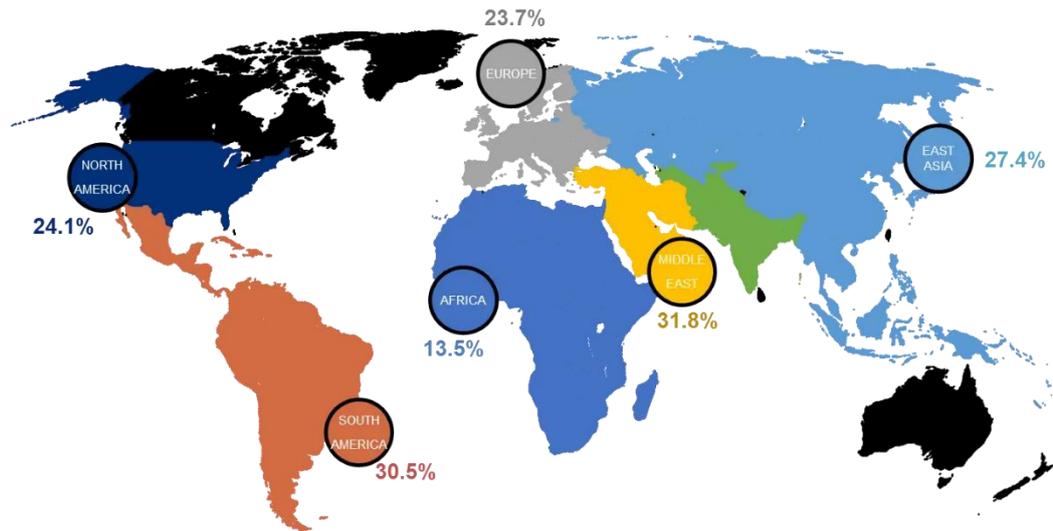


Figura 1. Adapted from : Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016 Jul;64(1):73-8

No entanto, nem todos os indivíduos com EH desenvolvem inflamação no fígado, e nem todos os casos de EHNA progridem para cirrose (DYSON; ANSTEE; MCPHERSON, 2014; EKSTEDT *et al.*, 2015). Além disso, fatores de risco como idade avançada, obesidade abdominal, presença de diabetes mellitus tipo 2 e fibrose hepática avançada aumentam as chances de progressão para as formas mais graves da doença (ANGULO *et al.*, 2015; TARGHER; BYRNE, 2013).

O diagnóstico da DHGNA geralmente envolve a exclusão do consumo excessivo de álcool e a avaliação de fatores de risco metabólicos. Testes de função hepática, exames de imagem, como ultrassonografia e ressonância magnética, e, em alguns casos, biópsia hepática, podem ser utilizadas para confirmar a presença de gordura no fígado e avaliar o grau de inflamação e fibrose (CHALASANI *et al.*, 2018; MARCHESINI *et al.*, 2016). Por outro lado, o manejo multidisciplinar da DHGNA envolve uma abordagem multifacetada que visa reduzir o acúmulo de gordura no fígado, controlar os fatores de risco metabólicos e prevenir a progressão da doença. Mudanças no estilo de vida, incluindo perda de peso gradual, dieta saudável, aumento

da atividade física e controle da glicemia e lipídios, são componentes essenciais deste tratamento. Nos casos mais avançados, podem ser necessárias terapias farmacológicas específicas e até mesmo, em alguns casos, de transplante de fígado (BASU; NOUREDDIN; CLARK, 2022; RINELLA, 2015).

1.2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA DHGNA

O processo inflamatório na formação da DHGNA está relacionado a uma resposta desregulada do sistema imune e a ativação excessiva de células inflamatórias no fígado (TACKE, 2017; TILG; MOSCHEN, 2010). Nesta etapa, o processo começa com o acúmulo de gordura nos hepatócitos. Com esse estímulo considerado crônico, as células hepáticas induzem a secreção de TNF- α , IL-1 e a IL-6 por células residentes no fígado, como as células de Kupffer, que recrutam e ativam leucócitos circulantes, como neutrófilos e monócitos, para o ambiente hepático (TACKE, 2017; WREE et al., 2014).

A ativação contínua dos leucócitos promove as lesões hepáticas e a progressão da DHGNA para estágios mais avançados e severos da doença, como a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), que é caracterizada pela inflamação hepática e associada a fibrose hepática e cirrose (TILG; MOSCHEN, 2010; WREE *et al.*, 2014). Recentemente, inúmeros grupos de pesquisa vêm estudando a participação dos tipos de leucócitos na DHGNA individualmente, principalmente os componentes do sistema imune inato.

Por exemplo, os monócitos residentes ou recrutados no ambiente hepático podem contribuir para a inflamação crônica e fibrose hepática, participando assim das lesões hepática na DGHNA (Smith et al. 2018). Eles produzem citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , que colaboram na ativação de células estreladas

hepáticas e na produção excessiva de matriz extracelular, resultando em fibrose. No entanto, outro estudo realizado por Li e colaboradores em 2020 apresenta uma perspectiva diferente. Os autores demonstraram que a ativação de monócitos durante a DGHNA é benéfica apresentando um efeito protetor no fígado devido a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), inibindo a inflamação hepática e promovendo a reparação tecidual.

1.3 A PARTICIPAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS DURANTE DGHNA

Apesar da importância dos neutrófilos na eliminação de microrganismos extracelulares, a sua participação nas lesões hepáticas durante a DHGNA vem sendo considerada fundamental no desenvolvimento e progressão da doença, pois quando ativadas de forma anormal, estas células levam a uma resposta inflamatória exacerbada no órgão (HWANG *et al.*, 2021a; VAN DER WINDT *et al.*, 2018). Alguns estudos relatam sobre a associação positiva entre a presença elevada de neutrófilos e a gravidade das lesões hepáticas na DHGNA, destacando sua participação na progressão da esteatose hepática para a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e fibrose hepática (TILG; MOSCHEN, 2010).

Uma vez recrutados no fígado, os neutrófilos podem liberar diferentes enzimas e espécies reativas de oxigênio que causam danos irreversíveis nas células hepáticas. Além disso, secretam citocinas (TNF α) e quimiocinas (CXCL1) que amplificam a resposta inflamatória no fígado agravando a progressão da lesão (CHRYSANTHOPOULOU *et al.*, 2014). Atualmente é conhecido que o aumento de neutrófilos no tecido hepático durante a DHGNA está associada a um maior grau de inflamação e fibrose.

No entanto, outros estudos sugerem que os neutrófilos podem ter um papel mais complexo no fígado, com algumas evidências indicando um possível efeito protetor que limitaria a resposta inflamatória local e, portanto, a progressão da doença (TILG; MOSCHEN, 2010). É importante ressaltar que a compreensão da função dos neutrófilos nas lesões hepáticas da DHGNA ainda é um campo em evolução, com pesquisas em andamento visando esclarecer melhor essa relação controversa. Mas o que se acredita, na atualidade, é que o papel dual (protetor vs. danoso) depende de inúmeras condições hepáticas e extra-hepáticas.

1.4 A PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS T E NK DURANTE DGHNA

Além do componente inflamatório induzida pelo recrutamento de fagócitos, como os neutrófilos e monócitos, a ativação das células presentes no microambiente hepático, como células T (CD4+ e CD8+) e células NK, desempenham papéis cruciais na fisiopatologia hepática durante o desenvolvimento da DHGNA (GEBRU et al, 2021; BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; KIRAN *et al.*, 2021).

As células T desempenham um papel crucial na regulação da resposta imune. Mas, no contexto da DHGNA e em doenças autoimunes, a ativação excessiva das células T contribui para a inflamação e a lesão hepática na esteatose hepática via produção de interferon gama (IFN- γ) (GEBRU et al, 2021). Da mesma forma, estudos recentes avaliaram o efeito das células CD4 efectoras em camundongos humanizados com DHGNA, foi observado que estas células contribuem para o desenvolvimento de fibrose acompanhado com produção de IFN, IL-6, IL17A e IL-18 (HER et al., 2020). Além disso, linfócitos CD4 foram encontrados em níveis elevados no sangue periférico de pacientes com DGNA e expressam altos níveis de IFN e IL-4 (RAU et al 2006).

Por outro lado, as células NK são células presentes em grande número no microambiente hepático e desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase do fígado (MARTÍNEZ-CHANTAR; DELGADO; BERAZA, 2021a). Essas células também são grandes produtoras de citocinas, como o IFN- γ , que possui um potente efeito inflamatório, potencializando as ações microbidas de outras células, como as células de Kupffer, e induzindo o recrutamento de neutrófilos para o ambiente hepático (CRAIG *et al.*, 2009; KHAN; LIU; XU, 2021). De maneira curiosa, estudos demonstram que a frequência células NK presentes no tecido hepático gorduroso em humanos e camundongos não se alteram, são grandes produtoras de IFN com capacidades citotóxicas reduzida (TOSELLO-TRAMPONT *et al* 2016). Entretanto, células NK em estudos com dieta deficiente em colina e metionina foi observado o aumento do infiltrado no microambiente hepático (FAN *et al.*, 2020)

Além disso, a participação das células NK durante o desenvolvimento da DHGNA ainda não está claro. Inúmeros estudos demonstraram que a frequência de células NK CD56^{hi} e CD56^{low} não se altera em sangue de pacientes com o fígado gorduroso (STIGLUND *et al*, 2019, TOSELLO-TRAMPONT *et al*, 2016). No entanto, apesar de ambas as populações não se alterarem, diferenças no fenótipo/receptor são encontradas. Além disso, outro grupo demonstrou que em modelo experimental e pacientes com DHGNA, o nível de expressão de IL-6R se encontra aumentado enquanto NKG2D se mostra reduzido (STIGLUND *et al*, 2019, THEURICH *et al*, 2017).

. A compreensão do mecanismo associado ao IFN- γ e outros mediadores secretados por células T e células NK é fundamental para melhorar a compreensão da patogênese da NAFLD e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras direcionadas para estes alvos imunológicos através da utilização de uma terapia biológica.

1.5 DHGNA E INFECÇÕES

Recentemente, Ebrahimi e colaboradores (2023) conduziram um complexo estudo sugerindo a existência de uma correlação entre a suscetibilidade de indivíduos com DHGNA em diferentes infecções. Os autores analisaram biópsias do fígado de 12.133 pacientes com DHGNA do período de 1969 até 2017 (EBRAHIMI *et al.*, 2023). De forma intrigante, eles observaram uma incidência elevada de infecções graves em pacientes com DHGNA sugerindo que esses indivíduos são mais suscetíveis a processos infecciosos sistêmicos, como a sepse, quando comparado com a população em geral. No entanto, são necessários estudos que visem entender os mecanismos envolvidos com o aumento da suscetibilidade de indivíduos com DHGNA durante processos infecciosos.

1.6 SEPSE

A sepse é uma síndrome em que o paciente sofre danos nos órgãos com risco de vida, devido a uma resposta inflamatória intensa desencadeada por uma infecção (RHODES *et al.*, 2017). O choque séptico, por sua vez, é caracterizado pela necessidade de vasopressores para manter a pressão arterial, representando um quadro de elevado índice de mortalidade para os pacientes (RHODES *et al.*, 2017).

Durante o curso temporal da sepse, ocorrem dois estágios com características distintas. O primeiro estágio, conhecido como hiper-inflamatório, é caracterizado por respostas inflamatórias intensificadas, desencadeada por uma série de eventos celulares que levam a danos teciduais em órgãos vitais, como o fígado, coração e pulmões (RELJA; LAND, 2020).

Em condições fisiológicas, diversos mediadores químicos são secretados pelas células do sistema imune inato e adaptativo em resposta à presença de agentes infecciosos e seus componentes como, por exemplo, os lipopolissacarídeos (LPS)

bacterianos (VAN DER POLL; OPAL, 2009). O LPS, encontrado principalmente na membrana externa de bactérias gram-negativas, é reconhecido pelo sistema imune inato como um sinal de infecção. A interação do LPS denominado padrão molecular associado a patógeno (PAMP) com os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como o Toll like receptor 4 (TLR4), presentes nas células imunes, como os monócitos/macrófagos, desencadeiam a ativação e a produção de diversos mediadores inflamatórios, como as citocinas (por exemplo TNF- α , IL-1, IFN- γ , IL-6), e as quimiocinas (CXCL1 e CXCL2) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Embora a resposta inflamatória seja essencial para combater a infecção, no estado hiperinflamatório da sepse, ela se torna intensificada, desequilibrada e, portanto, prejudicial. A produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias mencionadas acima é considerada um dos principais eventos que promovem a ativação descontrolada do sistema imune, como o recrutamento e infiltração excessiva de leucócitos presentes na circulação para os tecidos, e que está relacionada com danos teciduais, disfunção endotelial, distúrbios de coagulação, e comprometimento da função fisiológica dos órgãos vitais (ABE *et al.*, 2020a; COHEN, 2002).

Uma vez que o LPS ativa o sistema imune, sua administração em roedores vem sendo utilizada como um dos principais modelos de inflamação. Mais especificamente no caso da sepse, sua administração em altas doses mimetiza uma resposta inflamatória sistêmica, gerando danos teciduais graves e um alto índice de mortalidade.

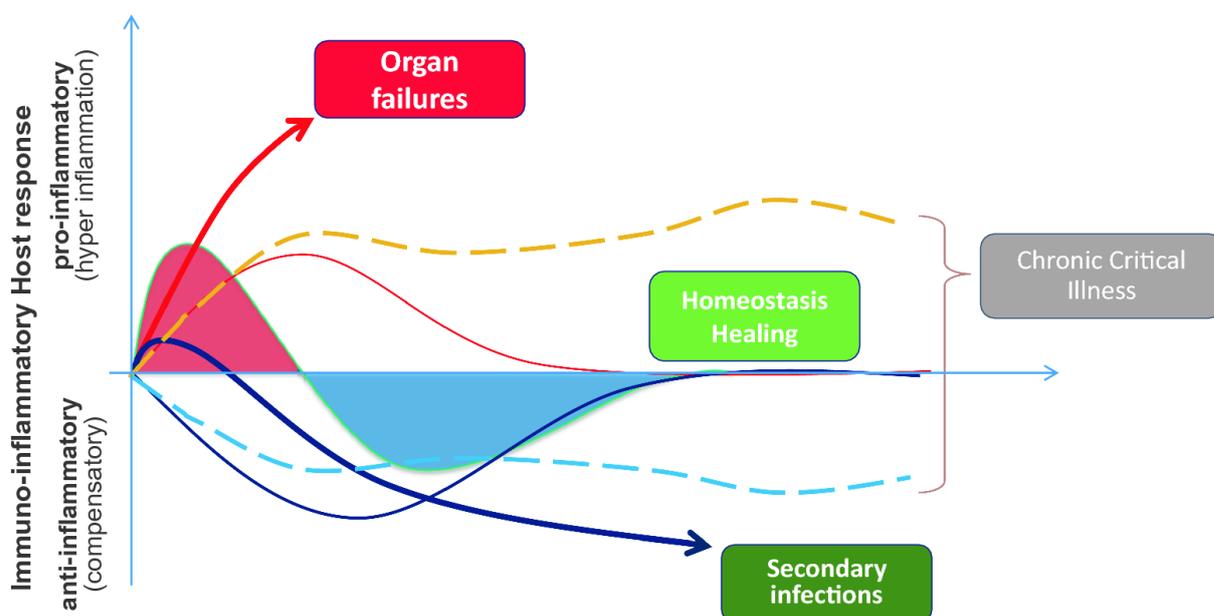


Figura 1 Estados Imuno-inflamatórios durante a sepse

Com o tempo, a resposta inflamatória na sepse pode evoluir para um segundo estágio com propriedades imunossupressoras (anti-inflamatório), na qual se observa um aumento na suscetibilidade do organismo a infecções secundárias.

O tratamento da sepse envolve a identificação e o tratamento precoces da infecção, além do suporte hemodinâmico e de cuidados de suporte para os órgãos afetados. Terapias direcionadas à modulação da resposta inflamatória, como o uso de corticosteroides ou imunomoduladores, têm sido estudadas, mas ainda são controversas e requerem mais evidências para sua utilização rotineira

1.7 A PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS NK DURANTE A SEPSE

As células NK, componentes essenciais da resposta imune inata capazes de eliminar células-alvo, como tumores e células infectadas por invasores intracelulares como *Staphylococcus spp.* e *Leishmania spp.* (CALIGIURI, 2008; VIVIER *et al.*, 2011). Aproximadamente 5-15% dos linfócitos presentes no sangue periférico humano são

classificados como células NK, e, além disso, diversas subpopulações específicas são encontradas em órgãos como o baço, fígado e pulmão (BIRON *et al.*, 1999; FREUD; CALIGIURI, 2006; SUN; LANIER, 2011a).

Durante um processo infeccioso, as células NK realizam suas funções de “killing” por meio de citotoxicidade e regulação imune, destruindo diretamente aquelas células que estão infectadas com microrganismos intracelulares. As células NK podem induzir a morte celular programada (apoptose) da célula-alvo através da interação do FAS-L com os receptores de morte FAS (TRAPANI, 2001). Além disso, podem destruir as células-alvo secretando inúmeras proteínas com propriedades citotóxicas que estão presentes em grânulos intracelulares, como perforina, granzima e α -defensinas (SERBINA *et al.*, 2008; SMYTH *et al.*, 2004; STENGER *et al.*, 1996). Por exemplo, as perforinas podem danificar a membrana celular das células alvo através da formação de poros, alterando a permeabilidade celular e induzindo a lise osmótica. Além disso, a abertura destes poros possibilita a entrada de outras moléculas, como as granzimas, que são responsáveis pela indução de apoptose de células alvo, como as bactérias *Mycobacterium*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (GROSS *et al.*, 2011; KUBES; MEHAL, 2012; SUN; LANIER, 2011b; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003).

Apesar do seu papel benéfico na proteção do organismo, as células NK participam de forma significativa nas respostas inflamatórias causadas por infecção (BJÖRKSTRÖM; STRUNZ; LJUNGGREN, 2021; TOSELLO-TRAMPONT *et al.*, 2017). No contexto da sepse, elas vêm sendo consideradas um importante fator de risco no agravamento dos danos teciduais durante a fase de hiper-inflamação já mencionada anteriormente (GUO *et al.*, 2018a; WANG, F. *et al.*, 2023). Na fase inicial da sepse, as células NK são ativadas, resultando na secreção de citocinas, como o

IFN- γ e TNF- α , que estão envolvidas com a ativação de outros tipos celulares, como os macrófagos e células dendríticas (WANG, F. *et al.*, 2023). Uma vez ativados, os macrófagos e células dendríticas secretam IL-2, IL-12 e IL-18 que, por sua vez, estão envolvidas com a ativação de outras células NK estabelecendo, desta forma, um ciclo de retroalimentação positiva, que leva a potencialização da resposta imune dependente de células NK (GUO *et al.*, 2018b; KHAWAR; ABBASI; SHEIKH, 2015). Esse ciclo amplifica as respostas pró-inflamatórias, resultando em uma tempestade de citocinas e, conseqüentemente, levando à falência de múltiplos órgãos devido ao aumento da produção de TNF, IL-6 e do recrutamento massivo de leucócitos para inúmeros órgãos vitais (GUO *et al.*, 2018a). Realmente, vários estudos têm demonstrado que a inibição das células NK durante sepse experimental reduz significativamente o dano de múltiplos órgãos causados pela inflamação, sugerindo a participação destas células na fisiopatologia da doença. Em diferentes modelos murinos de sepse, como a peritonite polimicrobiana induzida pela cirurgia de CLP, politrauma, ou infecção causado pela administração de *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* ou *Streptococcus pyogenes*, a depleção prévia das células NK com anticorpos como anti-asialoGM1 e anti-NK1.1, preveniu a exacerbação da inflamação sistêmica e dos danos dos órgãos vitais estabilizando o equilíbrio ácido-base na circulação, revertendo distúrbios fisiológicos e prolongando a sobrevivência (BADGWELL *et al.*, 2002; ENOH *et al.*, 2006; SHERWOOD *et al.*, 2003, 2004). (CAHILL *et al.*, 2020).

1.8 NEUTRÓFILOS E SEU PAPEL NA SEPSE

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares de vida curta pertencentes ao sistema imunológico inato e que são gerados continuamente a partir de precursores mieloides na medula óssea e estão presentes em alta quantidade na corrente

sanguínea. Os neutrófilos podem ser ativados por inúmeras moléculas de tecidos danificados (fontes endógenas) e bactérias (fontes exógenas), como citocinas, padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e fatores de crescimento. Esses fatores aumentam a vida útil dos neutrófilos e garantem sua migração e infiltração da circulação para o foco inflamatório através de um gradiente de concentração de estímulo quimiotático, como as quimiocinas ou produtos microbianos (KOLACZKOWKA et al, 2013). Estas células são extremamente eficazes no combate contra diferentes tipos de microrganismos e na limpeza de detritos celulares em processos sépticos e assépticos, respectivamente. Sua eficiência na eliminação de patógenos é devido a uma variedade ampla de mecanismos celulares, como fagocitose, desgranulação de proteinases, produção/liberação de moléculas com propriedades oxidantes (espécies reativas de oxigênio/nitrogênio), armadilhas extracelulares de neutrófilos (Neutrophil Extracellular Traps; NETs) e citocinas.

A importância dos neutrófilos na eliminação de agentes invasores pode ser observada nos casos relatados da sua deficiência na qual é descrito um estado de imunossupressão e o aumento do risco de infecções oportunistas. Por exemplo, indivíduos com doença granulomatosa crônica, uma condição hereditária que prejudica a NADPH oxidase, um complexo enzimático responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio, são mais suscetíveis à infecção microbiana e à sepse (ROHAN et al 2015). No entanto, uma vez que os mecanismos microbicidas dos neutrófilos apresentam propriedades inespecíficas, pois podem afetar indiscriminadamente células microbianas e hospedeiras, observa-se que os mesmos podem levar a danos graves em tecidos e órgãos vitais, como descritos em doenças autoimunes, infecciosas e traumáticas (WANG et al 2006).

No contexto de sepse, os neutrófilos desempenham um papel central na patologia inflamatória e também na disfunção de múltiplos órgãos (BROWN *et al.*, 2006). Os neutrófilos são recrutados intensamente durante o curso inflamatório da sepse. Durante esse período, ocorre produção intensa de quimiocinas, como CXCL1/CXCL2, que juntamente com TNF, induzem o recrutamento e infiltração massiva dos neutrófilos da corrente sanguínea para diferentes órgãos vitais, e não para o foco infeccioso, contribuindo assim para a bacteremia (Brown *et al.*, 2006). Um fato que foi observado na sepse, tanto em modelos experimentais quanto na clínica é que, independentemente do local inicial da infecção, os neutrófilos ativados são retidos nas amplas redes capilares de órgãos vitais, como fígado e pulmões, provocando danos extensos que levam ao comprometimento destes órgãos (Andonegui *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2008). Por exemplo, no fígado, a infiltração de neutrófilos contribui para lesões significativas das células hepáticas, promovendo hipoperfusão vascular e disfunção orgânica (DHAINAUT *et al.*, 2001). Embora a falência hepática fulminante seja uma complicação relativamente rara da sepse não severa, os danos no fígado causados pela resposta inflamatória induzida pela infecção bacteriana são bastante comuns na sepse grave e, portanto, a disfunção hepática vem sendo considerado um fator subestimado ou negligenciado na progressão e no alto índice de mortalidade da doença (DHAINAUT *et al.*, 2001; WANG, D.; YIN; YAO, 2014). Na endotoxemia, após a administração de LPS, os neutrófilos, similarmente ao que ocorre com pacientes com sepse, se acumulam nos sinusóides do fígado e nos capilares pulmonares, sugerindo que este modelo experimental pode ser útil no entendimento do papel destas células na fisiopatologia da doença.

Diversos estudos recentes vêm relatando a participação de diversas subpopulações de neutrófilos em diversas condições fisiológicas e patofisiológicas. Durante a sepse, por exemplo, ocorre um recrutamento excessivo de neutrófilos para vários órgãos via produção de CXCL1 e TNF (BROWN *et al.*, 2006). Estudos experimentais demonstram que, no microambiente inflamatório, os neutrófilos recrutados para o local podem sofrer a ação das moléculas inflamatórias secretadas e presentes no tecido, como o IFN γ , levando à expressão de PD-L1 (Ligante de Morte Programada) (WANG, J. FENG *et al.*, 2021a). O PD-L1 pode ser expresso em células imunes como células dendríticas, macrófagos, e células não parênquimais, como os hepatócitos. A sua interação com PD-1, presente em células T, B, e NK, é importante na regulação e controle da resposta imune, reduzindo a ativação e impedindo uma atividade imune exacerbada. Diferentes grupos demonstraram que neutrófilos de pacientes sépticos apresentam um aumento significativo na expressão de PD-L1 em neutrófilos circulantes em comparação com indivíduos saudáveis, e que estas células são associadas com uma condição inflamatória exacerbada, um maior risco de disfunção orgânica e um maior índice de mortalidade (WANG, J. FENG *et al.*, 2021a, Boomer *et al.* em 2012). Um outro estudo realizado por Hotchkiss *et al.* em 2013 investigou a expressão de PD-L1 em neutrófilos durante a sepse experimental e a sua importância na doença. Este grupo demonstrou um aumento significativo na expressão de PD-L1 em neutrófilos infiltrados nos pulmões e no fígado, órgãos geralmente afetados na sepse, e que a inibição da interação entre de PD-1 com PD-L1 resultou em uma redução da lesão tecidual, citocinas inflamatórias e uma melhora da sobrevivência dos animais.

Estes trabalhos, juntos, indicam que a expressão de PD-L1 em neutrófilos desempenham um papel importante nas lesões teciduais durante o desenvolvimento

da sepse, podendo estar ainda envolvida com a exacerbação da resposta imune. No entanto, mais estudos são necessários para entender completamente os mecanismos envolvidos e explorar o potencial de PD-L1 como um alvo terapêutico na sepse ou outras condições inflamatórias e infecciosas.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel dos neutrófilos nas lesões hepáticas induzidas pela sepse em animais com doença hepática gordurosa não alcoólica

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar possíveis alvos relacionados a suscetibilidade de indivíduos com DHGNA durante um estado hiperinflamatório em modelo experimental e humano;
- Avaliar a suscetibilidade em modelo experimental de DHGNA durante um estado séptico;
- Avaliar a produção de citocinas e determinar recrutamento celular durante o estado séptico de animais com DHNA;
- Determinar a participação de células T, NK, monócitos e neutrófilos durante o estado hiperinflamatório em animais com DHGNA
- Determinar a participação de neutrófilos PD-L1+ na suscetibilidade em animais com DHGNA durante um estado de sepse

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP) – Campos de Ribeirão Preto. Além disso, foram utilizados animais machos deficientes para CCR2^{-/-}, IFN γ ^{-/-} e TNFR1R2^{-/-} provenientes do biotério de camundongos especiais da mesma universidade, que foram adquiridos da Jackson Laboratory. Os animais foram mantidos no biotério departamental da Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), sob condições controladas de ciclo claro/escuro (12 horas/12 horas), umidade, temperatura e alimentação ad Libitum. Para desenvolvimento das doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas, animais foram submetidos a dieta hiperlipidêmica deficiente em colina (HFCD) durante 2 semanas (RHOSTER, SP). Os experimentos foram aprovados e conduzidos de acordo com o Comitê de Ética de Animais de Experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (número de registro: 193/2019) (**Anexo 1**).

3.2 INDUÇÃO DA ENDOTOXEMIA

Lipopolissacarídeo (LPS; Escherichia coli (O111:B4), L2630, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi administrado intraperitonealmente (10 mg/kg) em camundongos C57BL/6J, CCR2^{-/-}, IFN^{-/-}, TNFR1R2^{-/-} (com 5 a 6 semanas de idade e peso corporal de 22 a 26 g). O LPS foi previamente solubilizado em solução salina estéril e estocado em freezer a -70°C. Os animais foram sacrificados 6 horas após a administração do LPS.

3.3 COLETA DE PLASMA

Os animais foram submetidos a eutanásia com injeção intravenosa de Ketamina (100 mg/kg) e Xillalina (10 mg/kg). Após a confirmação da morte do animal, o sangue foi coletado através da punção do plexo orbital utilizando capilar contendo 20 ul de heparina. O plasma foi separado dos outros hemocomponentes através da centrifugação (450xg, 5 minutos, 4°C), coletado e armazenado em Freezer -70°C até a análise.

3.4 COLETA DE ÓRGÃOS

Após eutanásia, o fígado foi coletado para análise de citometria e quantificação de citocinas e quimiocinas. Previamente a coleta, os animais foram eutanasiados e perfundidos com a injeção de 20 ml de PBS no ventrículo direito. Foi realizada uma prévia incisão do átrio esquerdo que permitiu a saída do sangue e do fluido de perfusão.

Para citometria, os órgãos foram acondicionados em solução de digestão enzimática contendo 1 mg/ml de colagenase do tipo II (Sigma Aldrich - USP) em 2 ml de meio RPMI incompleto (Corning – USA) por 45 minutos a 37°C. Após incubação por 45 minutos, a digestão foi inibida com adição de 1 ml de RPMI contendo soro fetal bovino (Gibco-USA), e o material foi filtrado em cell strainer de 10 uM (Falcon-USA). Posteriormente, foram adicionadas as amostras em um gradiente de Percoll (GE Healthcare) montados em tubos de 50 ml (Falcon-USA) e centrifugados à 2100 RPMI, 30 minutos a 22°C. Por fim, as células não parênquimas foram separados de células parênquimas.

3.5 CITOMETRIA

Células do fígado foram condicionadas (10 minutos em temperatura ambiente) em solução de bloqueio de receptores Fc utilizando FcBlock (BD Biosciences, California-USA). Para marcação das células foi utilizado o coquetel de anticorpos: Viability BV510-1:3000; Ly6C PerCP- 1:300; Ly6G FITC- 1:300; CD11b APC-Cy7 - 1:300, CD45 PE-Cy7 1:300; PD-L1 APC- 1:300, MHC PE-Cy7: 1:300; IFN PE- 1:200; TNF PE- 1:200; tempo de marcação 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente as células foram lavadas com PBS e fixadas com 2% de paraformaldeído. Monócitos inflamatórios foram definidos CD11b^{high}, Ly6G⁻ e Ly6C⁺ e neutrófilos como Ly6G⁺; células NK foram definidas como CD3-NK1.1⁺ e células T CD3+NK1.1⁻.

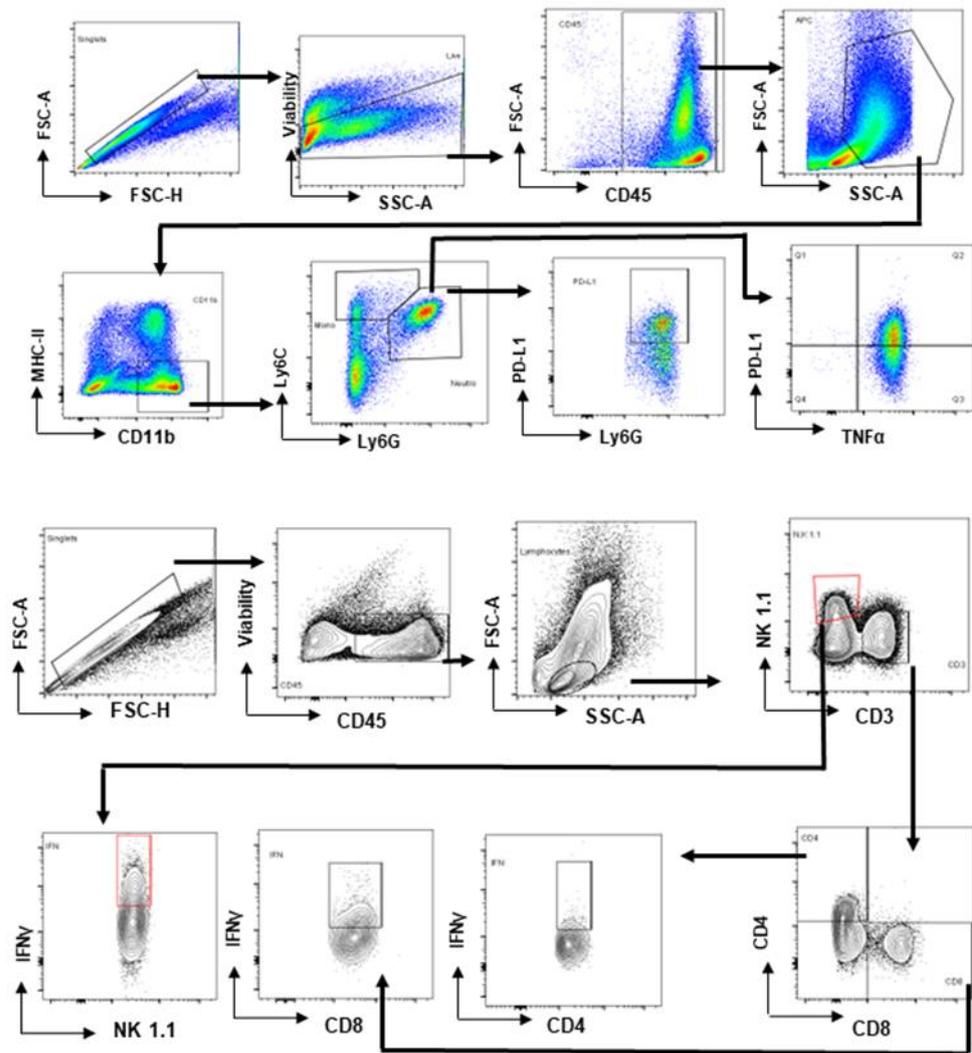


Figura 2 Estrategia de gated para fenotipagem celular

3.6 DOSAGEM DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS

Após coleta do plasma e tecidos, as concentrações de citocinas e quimiocinas foram determinadas através de ensaio imuno-enzimático (ELISA), seguindo o protocolo do fabricante (R&D Systems, Minneapolis -USA). Brevemente, o método consistiu no coating inicial com anticorpos de captura em placas de 96 poços durante 12 horas em refrigeração de 4°C. Em seguida, realizamos a lavagem dos anticorpos não ligados a placa com PBS-Tween (Sigma Aldrich -USA) por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionamos 50 ul de amostras a serem

quantificadas e os respectivos controles: curvas de calibração e um poço com ausência de amostra (branco) que foram incubados por 2h em temperatura ambiente. Após lavagem, adicionamos; uma solução 1x de estreptoavidina por 30 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem, adicionamos o substrato colorimétrico TMF (tetrametilbenzidina; Sigma) seguida de solução de inibição da reação (H_2SO_4 , 1 M). As reações foram lidas em equipamentos de espectrofotometria em comprimento de onda de 450 nm (Spectra Max-250, Molecular Devices).

As concentrações de citocinas e quimiocinas foram expressas em picogramas por ml (pg/ml). Para determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas nos tecidos, a quantificação por ELISA foi normalizada através do peso do órgão em gramas.

3.7 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILO MURINO

Foi obtida a medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6 em meio Hanks (Sigma-Aldrich). As amostras foram cuidadosamente pipetadas em um gradiente de Percoll (GE HealthCare) de concentrações 72% e 65% e centrifugadas por 30 minutos, a 1200g, a temperatura ambiente. As células polimorfonucleares foram separadas e lavadas com meio Hanks, ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 0,1% de BSA (Sigma-Aldrich) e contadas em câmara de Neubauer. Para a avaliação da pureza, foi feito um esfregaço das células e coradas em corante Panótico (Interlab) e avaliadas em microscópio.

3.8 DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Para a depleção dos neutrófilos utilizamos diferentes anticorpos/inibidores. O anticorpo Anti-Ly6G (BioXCell, catálogo # BP0075) foi administrado a uma dose de 500 mg/kg por camundongo (treze dias após o início da dieta, 24 horas antes da inoculação do LPS). Para estudos de sobrevivência, todos os anticorpos monoclonais

foram inoculados uma vez ao dia durante 7 dias consecutivamente. O inibidor de CXCR2 SB 225002 (Tocris, catálogo #2725/10) foi injetado em uma dose de 200 mg/kg intraperitonealmente utilizamos um protocolo semelhante ao anti-Ly6G. Para a depleção seletiva de neutrófilos que expressavam -PD-L1, o anti-PD-L1 (BioXCell, catálogo #BE0101) foi injetado na dose de 12,5 mg/kg 12 horas antes do desafio com LPS e novamente 1 dia após a injeção inicial. No grupo controle foi administrado anti-mouse IgG2b (12,5 mg/kg) (BioXCell, catálogo #BE0252).

3.9 DEPLEÇÃO DE CÉLULAS NK

Para a depleção in vivo de células NK, camundongos C57BL/6 machos receberam anticorpo neutralizante de células NK (BioXCell, catálogo # PK136) ou anticorpo monoclonal de IgG2 α de camundongo isótipo-marcado como controle (BioXCell, catálogo # BE0252) que foram administrados intraperitonealmente (150 μ g em 200 μ L de PBS 24 horas antes do desafio com LPS). Para avaliar a sobrevivência, o anticorpo foi inoculado 24 horas antes do desafio com LPS e, em seguida, uma vez ao dia durante 7 dias.

3.10 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE RNA DE CÉLULA ÚNICA

Reanalizamos os dados de transcriptômica de célula única (GSE166504) do fígado de camundongos com doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e seus respectivos grupos controle (GOVAERE *et al.*, 2020). O conjunto de dados foi baixado e o arquivo RDS foi importado para o ambiente R (71) na versão v4.2.3 e Seurat v4.1.1 (72), filtrando os genes expressos em pelo menos 300 células. Para a etapa de pré-processamento, células atípicas foram filtradas com base em três métricas (tamanho da biblioteca < 20.000, número de genes expressos entre 200 e 4.000 e expressão percentual de genes mitocondriais < 0,8). Os 3.000 genes variáveis

mais relevantes foram então identificados usando o método 'vst' com a função Find Variable Features. A porcentagem de genes mitocondriais foi corrigida na etapa de escalonamento e uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada usando os 3.000 genes variáveis mais relevantes, selecionando os 30 principais componentes para redução de dimensão por meio da Projeção Uniforme de Aproximação e Manifold (UMAP). Os clusters foram identificados usando a anotação dos autores. Em seguida, a análise de expressão gênica diferencial foi realizada usando a função FindAllMarkers no Seurat com parâmetros padrão para obter uma lista de marcadores gênicos significativos para cada cluster de células. A visualização dos genes que ilustram os níveis de expressão foi realizada usando comandos R/Seurat (DimPlot, FeaturePlot e DotPlot) com o uso dos pacotes ggplot2 (73) e scCustomize (74) do R.

3.11 ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO DE RNA

Os dados de RNA-seq foram obtidos de GSE185051 (75). O pacote R/Bioconductor edgeR foi utilizado para identificar genes diferencialmente expressos entre as amostras, após a remoção de características ausentes (contagem zero em mais de 75% das amostras) (76). Genes com uma mudança de dobra $> 0,5$ foram identificados como diferencialmente expressos.

3.12 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DE VIAS

A lista de genes diferencialmente expressos foi enriquecida utilizando o pacote R Cluster Profiler (8). Os termos de ontologia gênica (GO) na categoria de Processos Biológicos com $P < 0,05$ foram considerados significativos. Os termos GO enriquecidos estatisticamente significantes e não redundantes foram plotados.

3.13 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO

Para análise histopatológica, amostras de tecido hepático foram fixadas em formaldeído a 10% por 48 horas, e depois transferidos para álcool 70%. As amostras foram submetidas a uma bateria de desidratação em soluções com concentrações crescentes de álcool e xilol, e então foram incluídas em parafina, cortadas com auxílio do micrótomo (5 µm de espessura) e dispostos em lâminas. As lâminas foram incubadas a 60°C para fixação do corte e em seguida foram lavadas em xilol para retirar o excesso de parafina, e hidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao álcool 70%). Os cortes foram então corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), desidratados com concentrações crescentes de álcool (do álcool 70% ao absoluto), lavados com xilol e montados em lamínula com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil). As imagens foram obtidas em microscópio ótico em aumento de 40x.

3.14 ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão representados com média \pm desvio padrão (DP). Diferenças estatísticas foram determinados utilizando-se o teste *t* de *Student* ou a análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni, para amostras com distribuições normais. As análises foram feitas com auxílio do GraphPad-Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA) e foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de P igual ou menor a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 A ESTEATOSE HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA EXACERBA A PRODUÇÃO DE IFN-GAMMA E TNF-ALPHA, PROMOVENDO MAIOR SUSCEPTIBILIDADE À INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR LPS.

Para avaliarmos alterações da resposta imune no ambiente hepático na DHGNA, realizamos uma reanálise de um conjunto de dados de Bulk RNAseq de pacientes com DHGNA com o intuito de identificar possíveis alvos relacionados a processos inflamatórios nesta condição clínica (GOVAERE *et al.*, 2020). Nesta reanálise, quantificamos alterações na expressão de genes em amostras de pacientes com DHGNA e de indivíduos saudáveis. No presente estudo, quando comparamos os dois grupos, observamos a regulação positiva de 5240 genes, entre eles EIF4H, TMEM, MOB1A, SERBP1, TM9SF1, HINT3, ARF3, CHTF8, PDIA6, e 5806, e a regulação negativa de genes, como FOSB, KAT2A, SNRNP70, CCNL2, AMY2B, EXD3 e EBNA1BP2. Entre os genes com regulação positiva destacamos os genes CD274 e o IFNGR2, que são correspondentes ao PD-L1 e ao receptor de IFN- γ , respectivamente (Fig4A). Adicionalmente, realizamos uma análise de enriquecimento de vias dentro dos genes com regulação positiva usando a Gene Ontology (GO), que revelou um aumento na expressão de genes de diversas vias associados à diversas funções imunes tais como fagocitose, migração de leucócitos, resposta a produtos bacterianos, genes de resposta à interleucina-1-beta (IL1B), TNF α e IFN- γ (Fig4B).

Finalmente, realizamos reanálises de sequenciamento de Single Cell RNAseq camundongos com DHGNA recentemente publicado para confirmar se os genes associados ao IFN- γ e TNF α também se encontram regulados positivamente neste modelo murino de endotoxemia (SU *et al.*, 2023). Nesta reanálise, assim como observado na reanálise de material hepáticos de pacientes com DHGNA, notamos um

aumento na expressão de IFN- γ , CD274 e TNF α no fígado sob condição de DHGNA. Além destes dados, observamos um aumento no número de células mielóides, células T e células NK no tecido hepático nestas condições patológicas, sugerindo que estas células poderiam ser fontes de IFN- γ , CD274 e TNF α (Fig. 5A e 5B). Ao reanalisarmos especificamente a expressão destes genes naquelas células, concluímos que as células T e as NK apresentaram um aumento na expressão de IFN- γ , enquanto que os genes CD274 e TNF α estavam aumentados nas populações de células mielóides, como monócitos e neutrófilos (Fig5C). Esses dados sugerem que as vias associadas a IFN- γ , CD274 e TNF α podem estar associadas a resposta inflamatória exacerbada que foi observada durante a DHGNA.

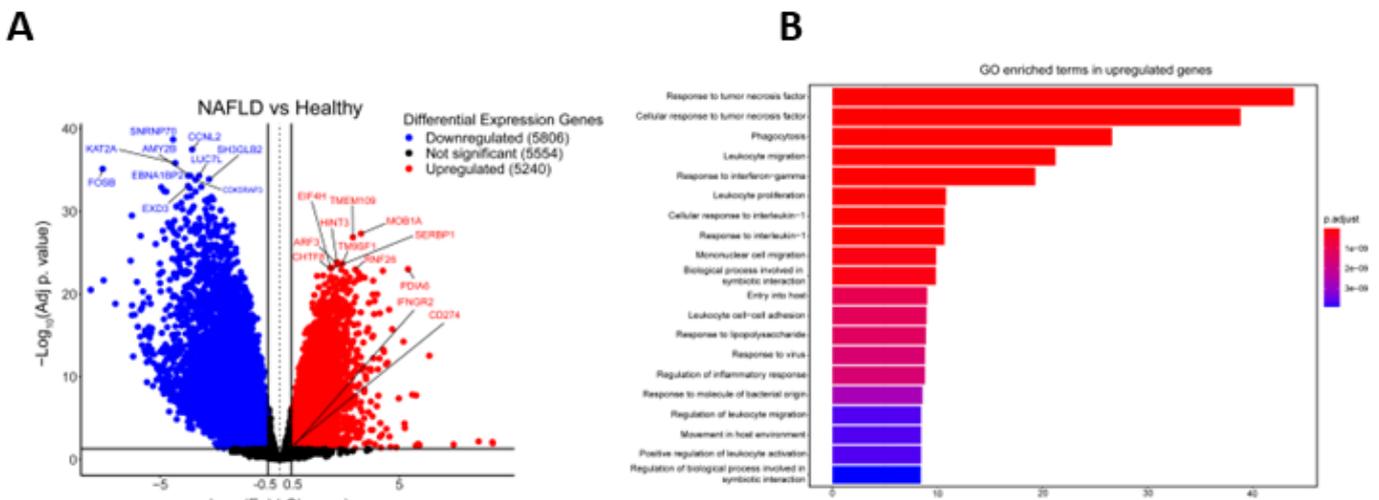


Figura 4- A expressão de genes das vias inflamatórias IFN γ e TNF α é aumentada durante o desenvolvimento da DHGNA em humanos. (A) Gráficos de vulcão mostrando a variação fold e o valor de P para a comparação da expressão gênica em fígados de pacientes com NAFLD em comparação com pacientes saudáveis. Os genes de interesse são indicados nos gráficos de vulcão. (B) Análise funcional GO dos DEGs. A análise de enriquecimento GO dos DEGs foi realizada usando o DAVID. Os 20 termos GO mais significativamente enriquecidos ($P < 0,05$) nos ramos de processo biológico, função molecular e componente celular são apresentados. Todos os valores estatisticamente significativos ajustados dos termos foram transformados em logaritmo negativo de base 10. DEGs são genes diferencialmente expressos; GO é a sigla para gene ontology.

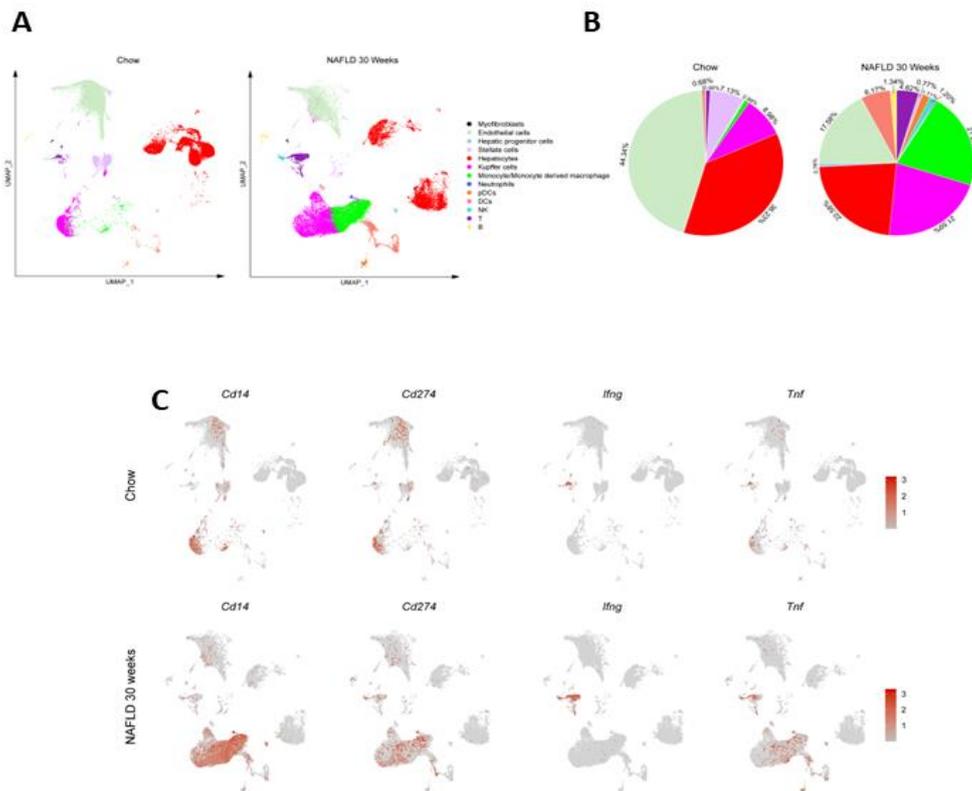


Figura 5- A expressão de genes das vias inflamatórias IFN γ e TNF α é aumentada durante o desenvolvimento da DHGNA em humanos. (A) Gráficos de vulcão mostrando a variação fold e o valor de P para a comparação da expressão gênica em fígados de pacientes com DHGNA em comparação com pacientes saudáveis. Os genes de interesse são indicados nos gráficos de vulcão. (B) Análise funcional GO dos DEGs. A análise de enriquecimento GO dos DEGs foi realizada usando o DAVID. Os 20 termos GO mais significativamente enriquecidos ($P < 0,05$) nos ramos de processo biológico, função molecular e componente celular são apresentados. Todos os valores estatisticamente significativos ajustados dos termos foram transformados em logaritmo negativo de base 10. DEGs são genes diferencialmente expressos; GO é a sigla para gene ontology.

Para estudar a DHGNA como uma comorbidade que aumenta a exacerbação de condições hiperinflamatórias, camundongos foram alimentados com uma dieta HFCD (High Fat Diet Coline Deficient) ou dieta controle (Chow), um modelo conhecido por induzir o desenvolvimento da DHGNA, por apenas duas semanas. É importante salientar que estes camundongos alimentados com esta dieta por duas semanas não apresentaram sinais de danos e resposta inflamatória no tecido hepático, conforme evidenciado pela ausência de aumento nos níveis plasmáticos de alanina

aminotransferase (ALT) (um marcador conhecido de lesão hepática) e infiltração de leucócitos no fígado, respectivamente (Fig6C).

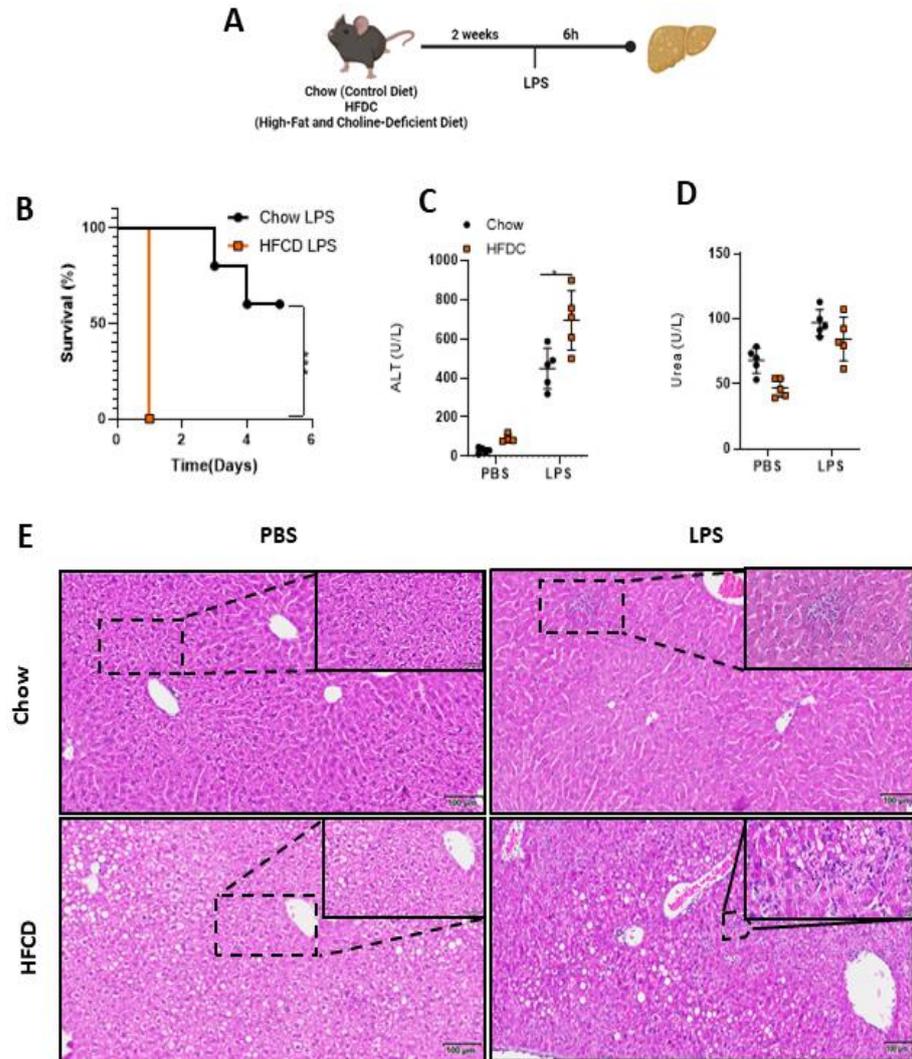


Figura 6. Camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura e deficiente em colina (HFCD) desenvolvem DHGNA e são mais suscetíveis à endotoxemia. (A) Ilustração esquemática do desenho experimental. **(B)** Curvas de sobrevivência de camundongos com DHGNA (n=5) e Chow (n=5) 7 dias após inoculação intraperitoneal de LPS (10 mg/kg). **(C e D)** Níveis séricos de ALT e ureia em camundongos com DHGNA e Chow, 6 horas após administração de LPS (10 mg/kg) e PBS (n=5). **(E)** Efeito da inoculação de LPS na histologia do fígado de camundongos com DHGNA e Chow.

Com o objetivo de investigar a resposta inflamatória sistêmica destes animais com DHGNA, mas na ausência de sinais de danos e inflamação hepática, desafiamos os mesmos com uma dose de LPS (10 mg/kg; intraperitoneal). Inicialmente, observamos que animais alimentados com dieta regular (grupo controle) apresentaram um índice de mortalidade que variou de 10 a 50% (Fig6A e 6B).

No entanto, observamos que os animais com DHGNA foram mais suscetíveis a endotoxina, apresentando elevado índice de mortalidade (100%) (Fig6B). Curiosamente, esses animais (que não apresentavam danos hepáticos decorrente da dieta) apresentaram extensos danos no fígado após a administração de LPS sem apresentar, no entanto, quaisquer sinais de lesão ou infiltração de leucócitos em outros órgãos vitais, como os rins (Fig6D), indicando que nas condições experimentais avaliadas, a resposta inflamatória patológica foi específica ao tecido hepático

Com base em nossa observação de aumento de IFN- γ e TNF α nas reanálises de RNAseq, investigamos o papel dessas citocinas na susceptibilidade dos camundongos com DHGNA quando desafiados com LPS. No presente estudo, observamos, 6 horas após o desafio com LPS, uma produção exacerbada de ambas as citocinas apenas no fígado do grupo alimentado com HFCD (Fig7A e 7B). Para confirmar o papel destas citocinas nas lesões de animais alimentados com HFCD durante endotoxemia, injetamos LPS em camundongos com DHGNA IFN- γ ^{-/-} e TNFR1R2 α ^{-/-} e observamos uma redução significativa nas lesões hepáticas quando

comparado com camundongos WT nas mesmas condições experimentais (Fig7C e 7D).

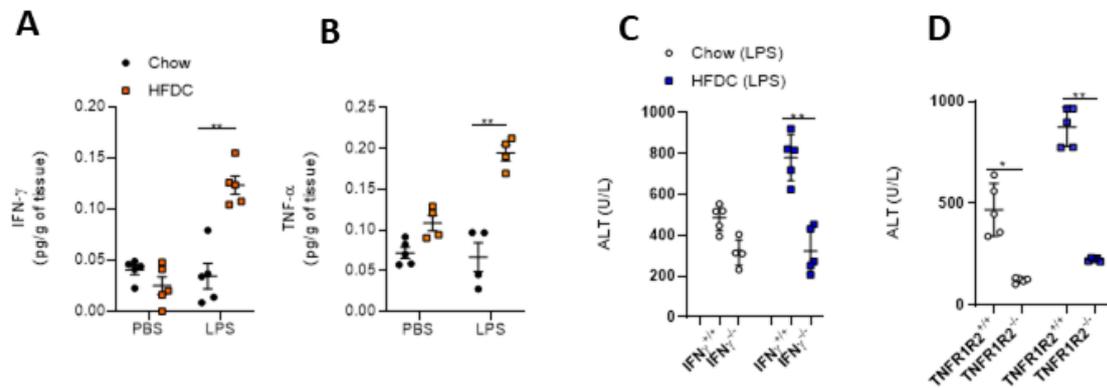


Figura 7- Animais com DHGNA possuem exacerbação de IFN γ e TNF α durante a endotoxemia. A) Secreção de IFN γ e (B) TNF- α nos fígados de camundongos Chow e DHGNA injetados com LPS (10 mg/kg) (n = 5). (C) Níveis séricos de ALT em camundongos com DHGNA e Chow e/ou com a deleção de IFN γ (IFN γ ^{-/-}) e (D) TNF α (TNFR1R2^{-/-}), 6 horas após administração de LPS (10 mg/kg) e PBS (n = 5).

Além disso, camundongos TNFR1R2^{-/-} e IFN- γ ^{-/-} com DHGNA após o desafio com LPS também apresentaram uma redução da infiltração de leucócitos no tecido hepático e uma melhora da sobrevivência (Fig8A, 8B e 8C), respectivamente. Em conjunto, esses dados sugerem que os níveis elevados de IFN- γ e TNF α contribuem para a susceptibilidade da DHGNA ao desafio do LPS. Finalmente, a ausência de IFN- γ e sinalização do TNF α , conforme evidenciado nos camundongos IFN- γ ^{-/-} e TNFR1R2^{-/-}, resultou na redução de lesões hepáticas, diminuição da infiltração de leucócitos e melhor índice de sobrevivência em animais endotoxêmicos alimentados com ração Chow e HFCD.

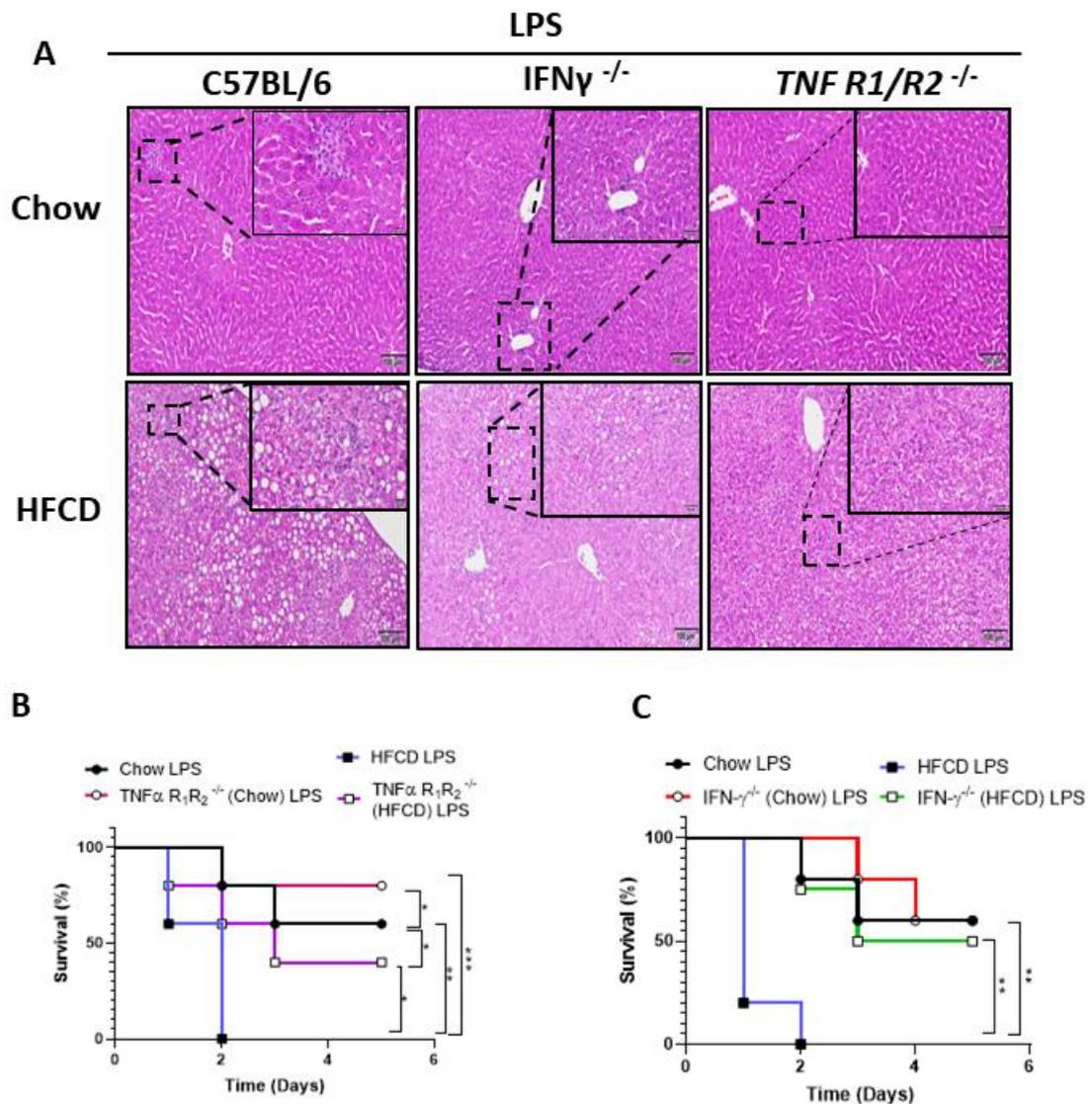


Figura 8 TNF- α e IFN- γ participam da susceptibilidade em camundongos com DHGNA à endotoxemia. (A) Efeito da inoculação de LPS na histologia do fígado de camundongos com DHGNA e Chow e/ou deleção de IFN (IFN γ ^{-/-}) e TNF (TNFR1R2^{-/-}). **(C)** Curvas de sobrevivência de camundongos com DHGNA (n = 5) e Chow (n = 5) e/ou deleção de IFN (IFN γ ^{-/-}) e **(B)** TNF (TNFR1R2^{-/-}), 7 dias após a inoculação intraperitoneal de LPS (10 mg/kg).

4.2 A ESTEATOSE HEPÁTICA NÃO ALCOÓLICA INDUZ O RECRUTAMENTO DE CÉLULAS NK QUE SÃO FONTES DE PRODUÇÃO DE IFN- γ NA ENDOTOXEMIA.

Considerando que as células T CD4 e CD8 são as principais fontes significativas de produção de IFN- γ durante a inflamação (BURKE et al, 2019), investigamos o papel destas células na susceptibilidade de camundongos com DHGNA. Inicialmente, observamos um aumento na produção de IFN por células T CD8 (Fig9B, 9D) e não por células T CD4 (Fig9A, 9C). Para entender sua participação na susceptibilidade de animais com NAFLD durante a hiperinflamação, desafiamos animais com DHGNA na ausência de células T (Rag -/-) e avaliamos sua sobrevivência. Surpreendentemente, os animais deficientes em células T HFCD permaneceram suscetíveis ao desafio com LPS (Fig9E), sugerindo que essas células não contribuem para a susceptibilidade a sepse e não são fontes de produção de IFN- γ durante a hiper-inflamação na DHGNA.

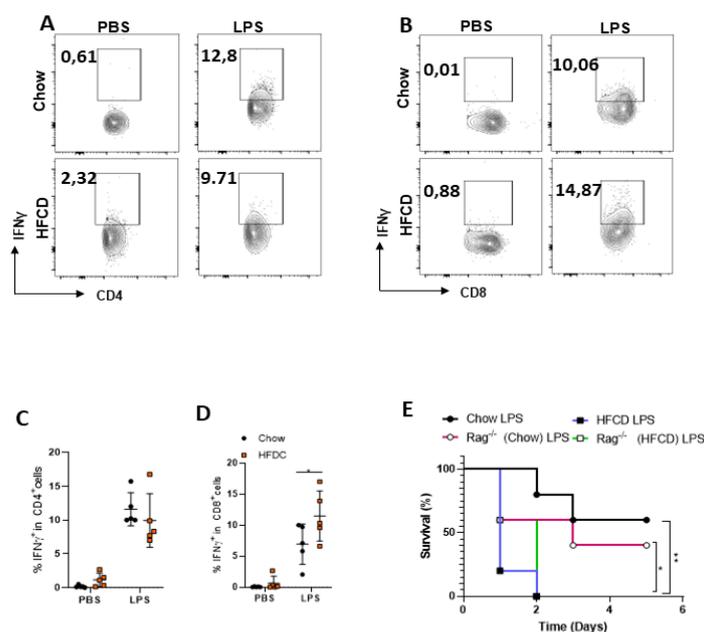


Figura 9- Células T não participam na suscetibilidade durante a endotoxemia na DHGNA. (A) Frequência de células T CD4 IFN e (B) células T CD8 IFN em animais com DHGNA e Chow 6 horas após a inoculação de LPS. (C) exibe as curvas de sobrevivência de camundongos com NAFLD (n = 5) e Chow (n = 5) e/ou deleção de células T (RAG^{-/-}). (D) e (E) representam o número de células e a frequência de células NK IFN NK em animais com DHGNA e Chow 6 horas após a inoculação de LPS, respectivamente.

Outras células produtoras de IFN- γ que são recrutadas para o tecido hepático durante a DHGNA e envolvidas na patogênese da sepse são as células NK (ARMER, et al. 2018, MARTINEZ-CHANTAR, et al. 2021, WANG et al, 2022, HE et al, 2016, JENSEN et al, 2018, KUMAR, 2019). Portanto, avaliamos a presença dessas células no tecido hepático em animais controle e endotoxêmicos e observamos que as células NK se encontram aumentadas somente após o desafio com LPS durante a DHGNA em comparação com os camundongos alimentados com ração normal e nos animais controle (Fig10A e 10C). Em concordância com estes resultados, nossas análises de citometria demonstraram que as células NK infiltradas no tecido hepático secretam altos níveis de IFN- γ (Fig10B e 10D). Para avaliar a participação das células NK durante a hiper-inflamação na DHGNA, depletamos essas células tratando os animais com anticorpo anti-NK 1.1 que, em seguida, foram desafiados com LPS. No presente

estudo, os animais com NAFLD e células NK depletadas apresentaram uma melhora na sobrevivência (Fig10E), confirmando a participação das células NK na susceptibilidade de animais com DHGNA ao desafio com LPS. Além disso, quando as células NK estão ausentes, os animais com DHGNA apresentam uma redução dos danos hepáticos (Fig10F), e nos níveis hepáticos de IFN- γ (Fig10G) e TNF α (Fig10H).

Adicionalmente, observamos também que nos animais deficientes em IFN- γ , a produção de TNF α também é atenuada (Fig10I), sugerindo que o IFN- γ é responsável pela produção de TNF α na NAFLD durante a endotoxemia. Nossos dados demonstrando que as células NK de camundongos com DHGNA expressam IFN- γ após o desafio com LPS, em conjuntos com aqueles que demonstram que a regulação positiva das vias de IFN- γ observada nas células T e NK na análise de scRNAseq (Fig 5), sugerem que essa citocina desempenha um papel crucial na resposta hiper-inflamatória em animais alimentados com HFCD.

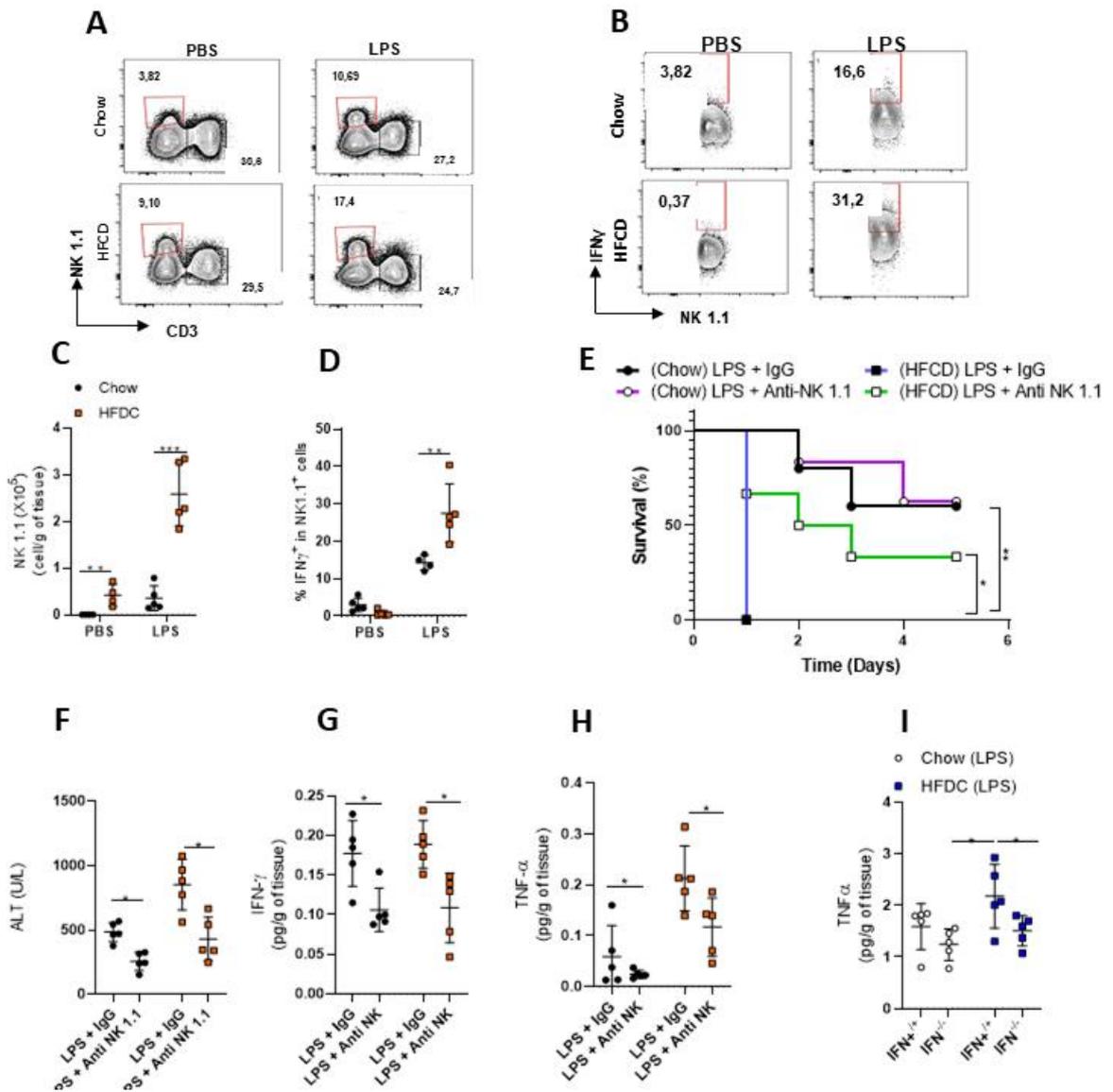


Figura 10- Células NK são grandes fontes produtoras de IFN e participam da suscetibilidade durante a endotoxemia na DHGNA. (A) Gated representativo das populações de NK 1.1+CD3-. (B) Gated representativo da produção de IFN pelas células NK. (C) e (D) representam o número de células e a frequência de células NK IFN nas células de animais com DHGNA e Chow, respectivamente, 6 horas após a inoculação de LPS. (E) mostra as curvas de sobrevivência de camundongos com DHGNA (n = 5) e Chow (n = 5) e/ou células NK esgotadas (Anti NK 1.1), 7 dias após a inoculação intraperitoneal de LPS (10 mg/kg). (F) apresenta os níveis séricos de ALT de camundongos com NAFLD e Chow e/ou células NK esgotadas (Anti NK 1.1), 6 horas após a administração de 10 mg/kg de LPS e PBS (n = 5). (G) e (H) mostram a secreção de IFN e TNF-α nos fígados de camundongos Chow e DHGNA injetados com LPS (10 mg/kg) (n = 5), respectivamente. (I) mostra a secreção de TNF-α nos fígados de camundongos Chow e NAFLD e/ou com deleção de IFNγ (IFNγ^{-/-}) injetados com LPS (10 mg/kg) (n = 5).

4.3 NEUTRÓFILOS SÃO RESPONSÁVEIS PELA SUSCETIBILIDADE DURANTE A HIPERINFLAMAÇÃO NA DHGNA.

Durante o desenvolvimento da DHGNA, é bem estabelecido que células do sistema imune inato, como monócitos e neutrófilos, são recrutadas inicialmente para o tecido hepático (ARMER et al, 2018, NATI et al,2021). Com isso em mente, desafiámos camundongos com DHGNA com LPS para que, em seguida, avaliássemos a infiltração dessas células no fígado. Seis horas após a administração do LPS, observamos que os monócitos são recrutados de maneira exacerbada para o local (Fig11A e 11B).

Uma vez que monócitos inflamatórios emigram da medula óssea para a periferia via CCR2 e, posteriormente, migram para os tecidos inflamados (MARTÍNEZ-CHANTAR et al, 2021 WANG et al, 2022, LI et al, 2020, KRENKEL et al, 2018), investigamos o papel dos monócitos na DHGNA usando camundongos endotoxemicos knockout para o receptor CCR2 (CCR2^{-/-}). Após a administração com LPS, os animais CCR2^{-/-}, permaneceram suscetíveis ao desafio apresentando mesmo índice de mortalidade dos animais controle (CCR2^{+/+})(Fig12A e 12B), sugerindo que os monócitos não participam do aumento da suscetibilidade á hiperinflamação em animais com DHGNA.

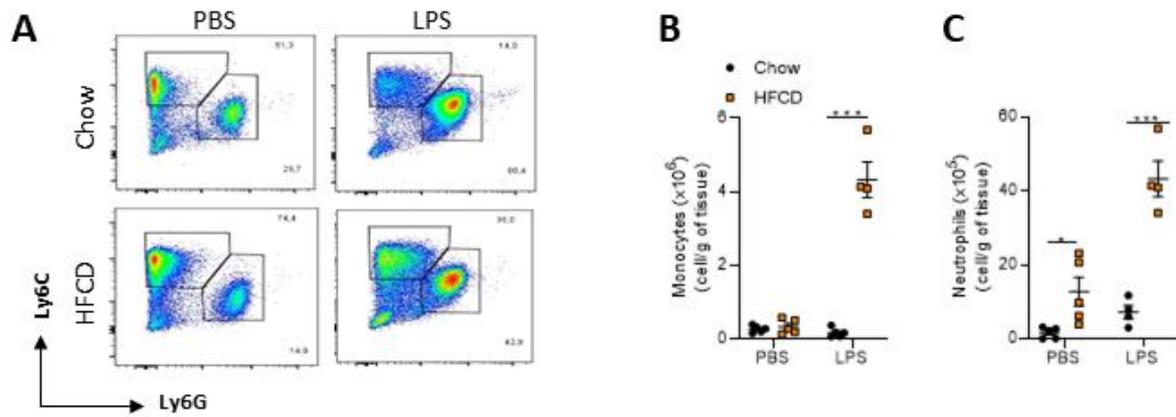


Figura 11- Monócitos e neutrófilos são recrutados durante a endotoxemia na DHGNA. (A) Gráfico representativo de citometria de fluxo mostrando monócitos (CD45+CD11B+MHC-Ly6C+Ly6G-) e neutrófilos (CD45+CD11B+MHC-Ly6C+Ly6G+) e o número de monócitos (B) e neutrófilos (C) em animais com DHGNA e Chow após a inoculação de LPS. (A) Gráfico representativo de citometria de fluxo mostrando monócitos (CD45+CD11B+MHC-Ly6C+Ly6G-) e neutrófilos (CD45+CD11B+MHC-Ly6C+Ly6G+) e o número de monócitos (B) e neutrófilos (C) em animais com DHGNA e Chow após a inoculação de LPS.

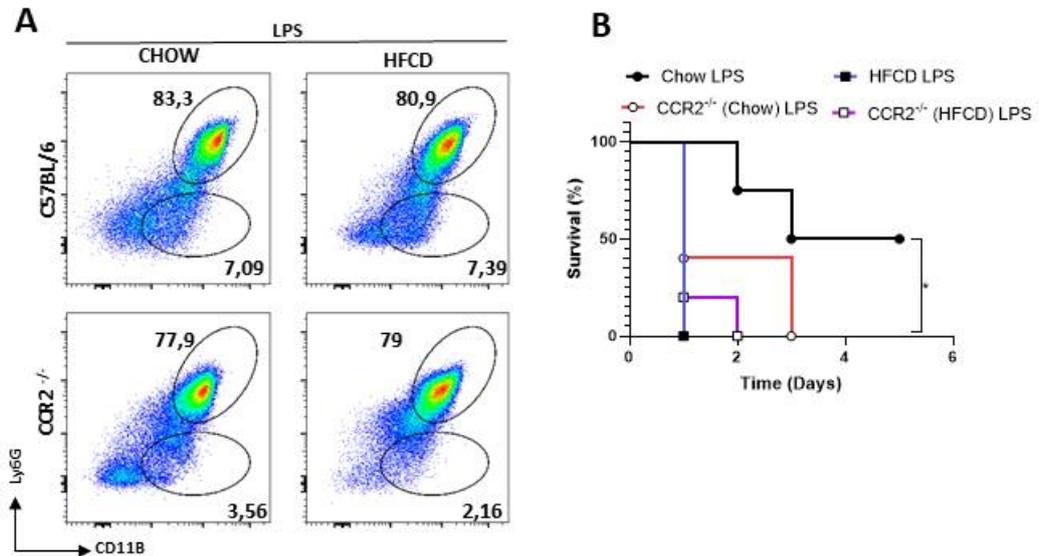


Figura 12. Os monócitos não participam da susceptibilidade em camundongos com DHGNA à endotoxemia. Gráfico representativo de citometria de fluxo mostrando monócitos em camundongos C57BL/6 e CCR2^{-/-} com DHGNA e Chow 6 horas após o desafio com LPS 10 mg/kg. Curvas de sobrevivência de camundongos com DHGNA (n = 5) e Chow (n = 5) e/ou deleção de CCR2 (CCR2^{-/-}), 7 dias após a inoculação intraperitoneal de LPS (10 mg/kg).

Na sequência, investigamos a participação de neutrófilos na susceptibilidade à hiper-inflamação em animais endotoxêmicos com DHGNA, uma vez que altos níveis de neutrófilos são detectados no tecido hepático durante a DHGNA (Fig11A e 11C) e seu recrutamento exacerbado também ocorre durante um estado hiper-inflamatório induzido por LPS (Fig11A e 11C). Para investigar o papel da participação dos neutrófilos na hiper-inflamação durante a DHGNA, os animais alimentados com HFCD foram tratados um dia antes do desafio com LPS com CXCR2i, que possui a propriedade de inibir a migração dos neutrófilos, ou anticorpo anti-LY6G, que depleta os neutrófilos. No presente estudo, observamos que, após os tratamentos com as drogas citadas reduziram a infiltração de leucócitos para o tecido hepático (Fig13A) e

níveis elevados de biomarcadores de lesões hepáticas (ALT) (Fig13B) e de inflamação (TNF α) (Fig13C). Avaliando a participação dos granulócitos na suscetibilidade durante a hiper-inflamação na DHGNA, animais tratados com CXCR2i e anti-Ly6G também apresentaram uma melhora significativa em sua sobrevivência (Fig13D e 13E), sugerindo um papel crucial de neutrófilos na suscetibilidade na DGNA durante a hiper-inflamação.

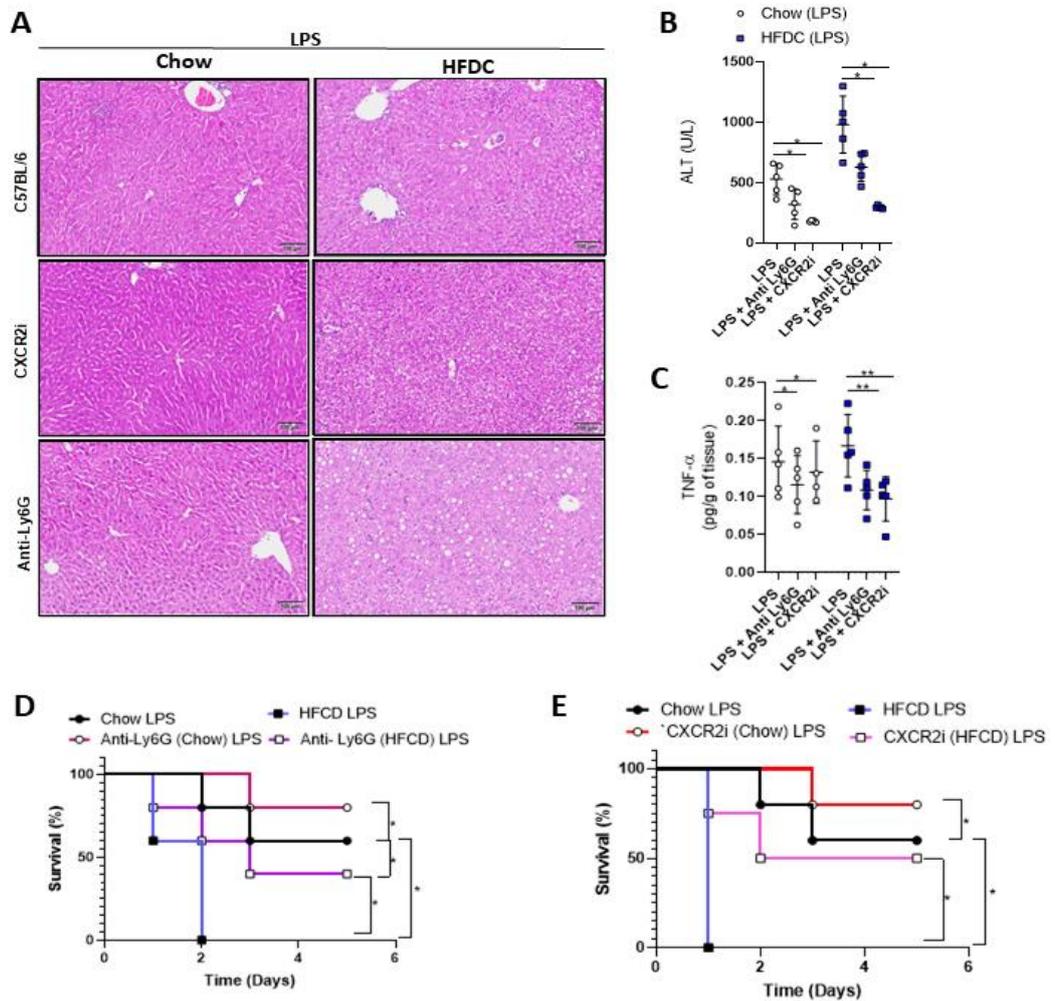


Figura 13- Neutr3filos mediam a suscetibilidade de animais com DHGNA 3 endotoxemia. (A) Efeito da inocula33o de LPS na histologia do f3gado de camundongos com DHGNA e Chow tratados com um inibidor de CXCR2 (CXCR2i) e animais depletados de neutr3filos (anti-Ly6G). (B) N3veis s3ricos de ALT de camundongos com DHGNA e Chow e/ou CXCR2i e anti-Ly6G, 6 horas ap3s a administra33o de 10 mg/kg de LPS e PBS (n=5). (C) Secre33o de TNF- α no f3gado de camundongos Chow e NAFLD injetados com LPS (10 mg/kg) (n = 5). Curvas de sobreviv3ncia de camundongos com DHGNA (n=5) e Chow (n=5) e/ou anti-Ly6G (D) e (E) CXCR2i, 7 dias ap3s a administra33o intraperitoneal de LPS (10 mg/kg).

4.6 IFN- γ induz expressão de PD-L1 em neutrófilos durante DGNA

O IFN- γ é uma citocina inflamatória que desempenha um papel crucial na resposta imune mediada por células T e NK (ARASE; ARASE; SAITO, 1996; ERIGUCHI *et al.*, 2018a; HE *et al.*, 2016; JENSEN *et al.*, 2018; KUMAR, 2019a; LIN *et al.*, 2021a). No entanto, estudos recentes têm mostrado que o IFN- γ também pode influenciar a expressão de moléculas de checkpoint imunológico, como a proteína de ligação à morte programada 1 (PD-L1) nas células imunológicas, incluindo neutrófilos (CARRANZA-TREJO *et al.*, 2021; FALCINELLI *et al.*, 2023a). A expressão de PD-L1 em neutrófilos tem sido demonstrada em diversas condições inflamatórias e infecciosas, incluindo sepse, tuberculose e câncer (ERIGUCHI *et al.*, 2018b; KRENKEL *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2021b; MCNAB *et al.*, 2011a; THANABALASURIAR *et al.*, 2021a; WANG, J. FENG *et al.*, 2021b). Ao reanalisarmos conjuntos de dados de células únicas de pacientes e camundongos com DHGNA, observamos um aumento na expressão dos genes CD274 e TNF α em neutrófilos. Curiosamente, o IFN- γ é regulado positivamente em células NK e é responsável por induzir a expressão de CD274 e TNF α em várias células (Fig5D e 5F). Investigamos se o IFN- γ induz a expressão de PD-L1 em neutrófilos durante a hiper-inflamação na NAFLD. Curiosamente, em camundongos com NAFLD, os neutrófilos mostraram aumento da expressão de PD-L1 quando comparados aos que receberam uma dieta normal (Fig14A). Além disso, quando desafiados com LPS, os camundongos com DHGNA apresentaram um número exacerbado de neutrófilos PD-L1+ (Fig14B).

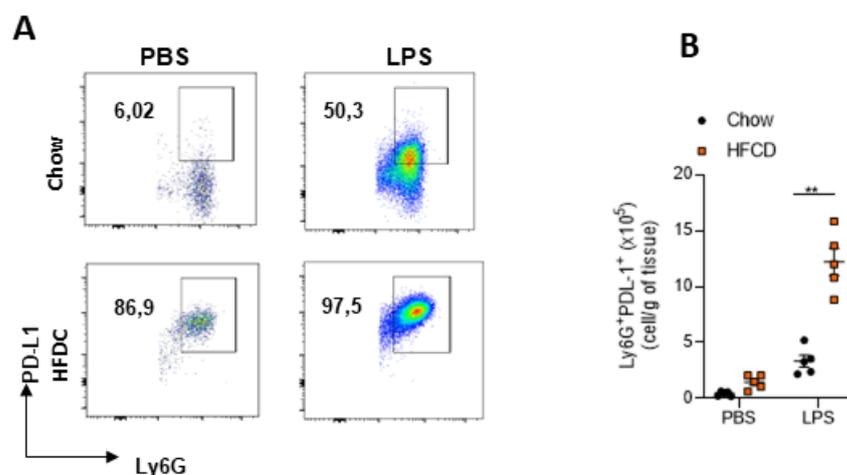


Figura 14- Neutr3filos expressam PD-L1 durante endotoxemia na DHGNA. (A) Gráfico representativo de citometria de fluxo mostrando a expressão de PD-L1 em neutr3filos selecionados e (B) a quantificação de neutr3filos PD-L1+ no f3gado de camundongos com DHGNA e Chow 6 horas após a inoculação de LPS (n=5 por grupo).

Em seguida, investigamos se o IFN- γ é um fator importante para a regulação positiva de PD-L1 em neutr3filos durante a DHGNA. Camundongos com DHGNA e sem IFN- γ (IFN γ -/-) foram desafiados com LPS e avaliados quanto à expressão de PD-L1 nos granulócitos. Curiosamente, na ausência de IFN- γ , os neutr3filos não expressaram PD-L1, e sua infiltração no f3gado foi atenuada (Fig15A e 15B).

Como observado na sepse, os neutr3filos PD-L1 apresentaram taxas reduzidas de apoptose (WANG, J. FENG *et al.*, 2021b). Na sequência, cultivamos neutr3filos na presença de IFN e/ou LPS e avaliamos a taxa de apoptose nestas células. Curiosamente, nessas condições *in vitro*, os neutr3filos expressaram PD-L1 e apresentaram taxas reduzidas de apoptose (Fig15C e 15D), sugerindo que neutr3filos que expressam PD-L1 poderiam sobreviver por longos períodos no ambiente hepático na DHGNA, acentuando a resposta inflamatória induzida por LPS.

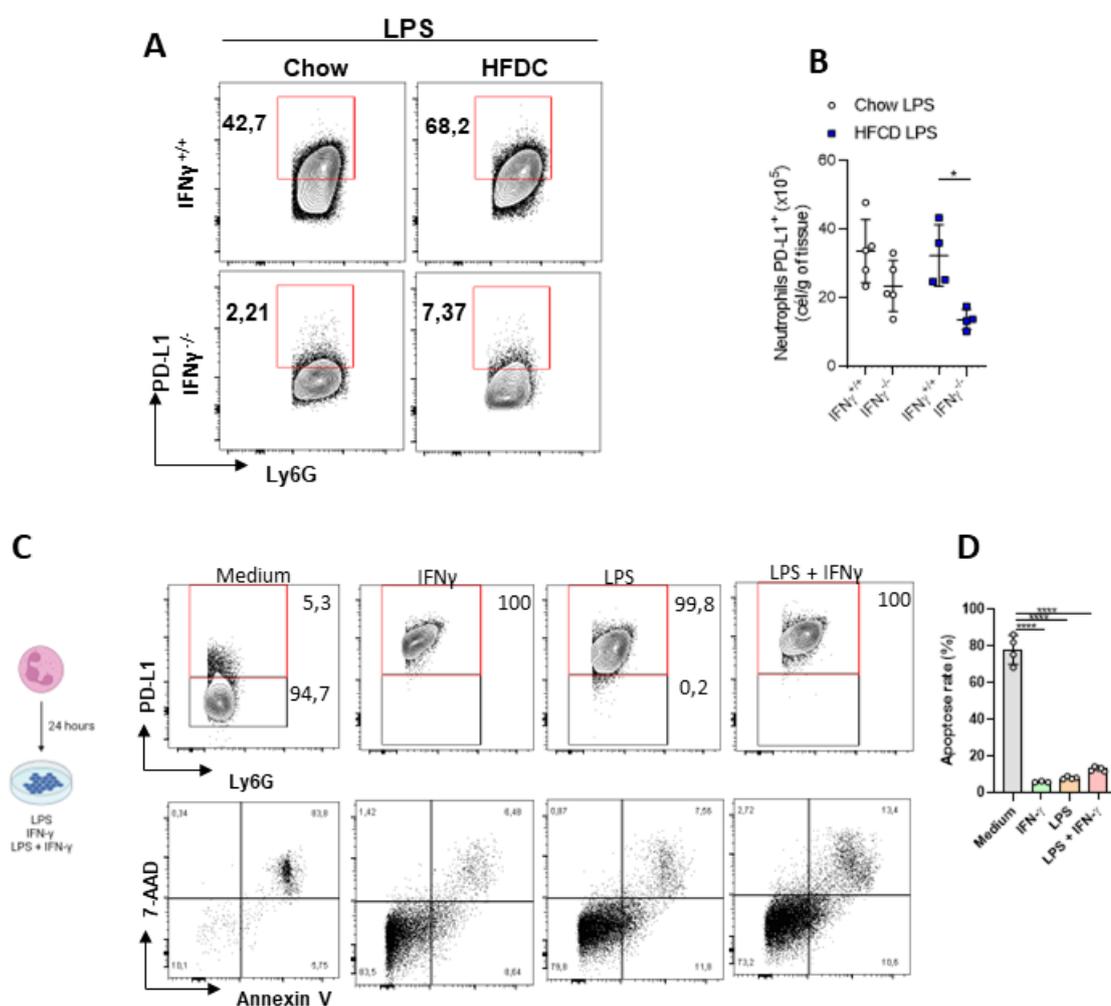


Figura 15- O IFN- γ induz a expressão de PD-L1 e reduz a apoptose em neutrófilos de camundongos com DHGNA. (A) Gráfico representativo de citometria de fluxo mostrando a expressão de PD-L1 em neutrófilos selecionados e (B) a quantificação de neutrófilos PD-L1+ no fígado de camundongos com DHGNA e Chow e/ou com deficiência de IFN γ (IFN γ ^{-/-}) 6 horas após a inoculação de LPS (n=5 por grupo). (C) Gráfico representativo de citometria de fluxo mostrando a expressão de PD-L1 e apoptose (Annexin V+ 7AAD+) em neutrófilos selecionados e (D) a frequência de apoptose em neutrófilos cultivados em meio, LPS, IFN ou LPS+IFN por 24 horas

Descobrimos que, tanto em condições de estado estável quanto hiper-inflamatório, os neutrófilos hepáticos de camundongos com DHGNA exibem um nível robusto de expressão de PD-L1 em comparação com os neutrófilos de seus respectivos grupos de controle (grupos A x B da Figura 5 e grupos C x D, respectivamente). Além disso, essa expressão robusta e distinta de PD-L1 nos

neutrófilos hepáticos de animais controle e com DHGNA hiper-inflamada não é encontrada nos respectivos equivalentes pulmonares (Figura 16).

Esse achado sugere que essa alteração imunológica observada em camundongos com DHGNA é uma condição específica do órgão, corroborando com nossos dados anteriores que demonstraram que a lesão hepática induzida por LPS é encontrada apenas no fígado em animais alimentados com HFCD (Figura 6C).

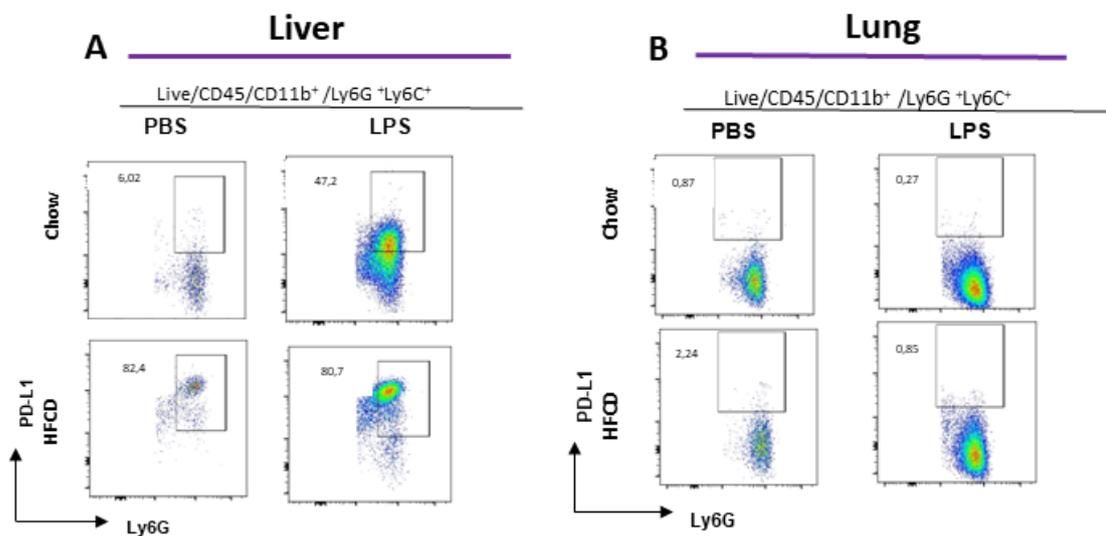


Figura 16-A expressão de PD-L1 em neutrófilos ocorre no fígado e não nos pulmões em animais com DHGNA durante a endotoxemia. Gráfico representativo de citometria de fluxo mostrando a expressão de PD-L1 em neutrófilos selecionados no fígado e pulmões de camundongos com DHGNA e Chow 6 horas após a inoculação de LPS (n=5 por grupo).

4.8 Os neutrófilos expressam PD-L1 e secretam TNF α durante a hiperinflamação na DHGNA

Estudos recentes sugerem que a expressão de PD-L1 nas células do fígado pode estar envolvida na patogênese da DHGNA (LOMBARDI et al, 2022 DONG et al,2022), enquanto a secreção de TNF α pelos neutrófilos pode desempenhar um papel crítico na inflamação hepática associada à DHGNA (WANG et a, 2021, FALCINELLI et al, 2023). No entanto, a relação entre PD-L1 e TNF α produzido pelos neutrófilos ainda não foi explorada. Sabe-se que o IFN- γ é uma citocina-chave que pode induzir a expressão de PD-L1 nas células do fígado durante a DHGNA (CARPINO et al, 2020, LOMBARDI et al, 2023). Assim, o entendimento da relação entre a expressão de PD-L1 induzida por IFN- γ e a secreção de TNF α pelos neutrófilos durante a DHGNA pode ter implicações importantes para o desenvolvimento de terapias imunomoduladoras para doenças hepáticas.

Para investigar uma possível conexão em nosso estudo, animais com DHGNA foram expostos a LPS e a secreção de TNF α pelos neutrófilos PD-L1+ foi avaliada. Observamos uma produção exacerbada de TNF α pelos neutrófilos PD-L1+ na DHGNA após a administração de LPS quando comparados aos neutrófilos de animais do grupo controle (Figura 17A, B e D).

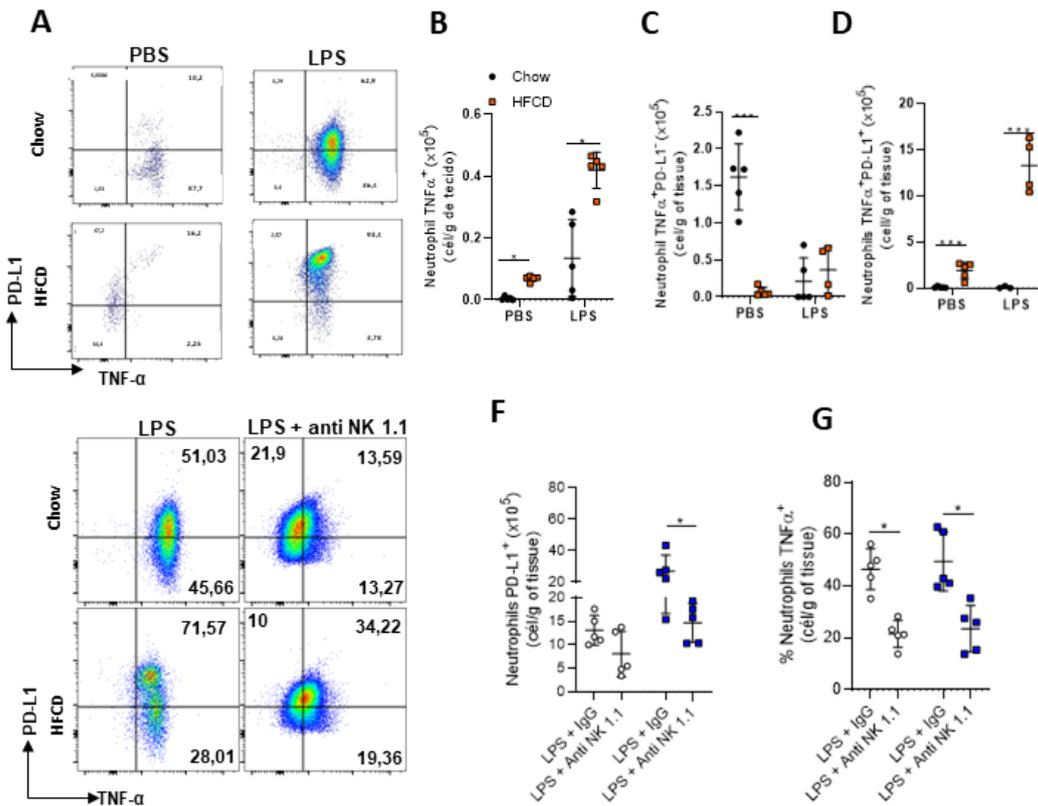


Figura 17-A secreção dependente de IFN- γ de TNF- α por neutrófilos PD-L1+ induz a susceptibilidade de animais com DHGNA à endotoxemia. (A) Gráfico representativo de citometria de fluxo mostrando a expressão de TNF em neutrófilos PD-L1+ no fígado de animais com DHGNA e Chow 6 horas após a inoculação de LPS. (B) Número de neutrófilos TNF+. (C) Número de neutrófilos TNF+PD-L1-. (D) Número de neutrófilos TNF+PD-L1+. (E) Gráfico representativo de citometria de fluxo mostrando a expressão de TNF em neutrófilos PD-L1+TNF+ no fígado de animais com DHGNA e Chow e/ou depletados de células NK (anti-NK 1.1) 6 horas após a inoculação de LPS. (F) Número de neutrófilos PD-L1+. (G) Frequência de neutrófilos TNF+.

Na sequência, devido ao envolvimento do TNF α em várias respostas inflamatórias sistêmicas na sepse, investigamos o papel do TNF α em animais endotoxêmicos com DHGNA. Com isso em mente, para avaliar o efeito da ausência de TNF α em animais com DHGNA, desafiamos animais deficientes na sinalização do TNF α (TNF R1R2^{-/-}) com LPS e avaliamos o seu papel na migração de neutrófilos. De maneira interessante, a ausência da sinalização de TNF durante o desafio com LPS não impacta no recrutamento (Fig 18 A e 18C) e expressão de PD-L1 (Fig 18 B e 18D) nos neutrófilos no ambiente hepático. Além disso, não altera a produção de IL-10 (Fig 18E) e IFN (Fig 18G) em animais TNFR1R2^{-/-} submetidos à dieta HFCD durante o estado inflamatório. Esses resultados sugerem que, embora o TNF α seja crucial na fisiopatologia da endotoxemia, a ausência de sua sinalização intracelular não compromete significativamente a migração de neutrófilos ou a expressão de PD-L1 no local da inflamação (Fig 18)

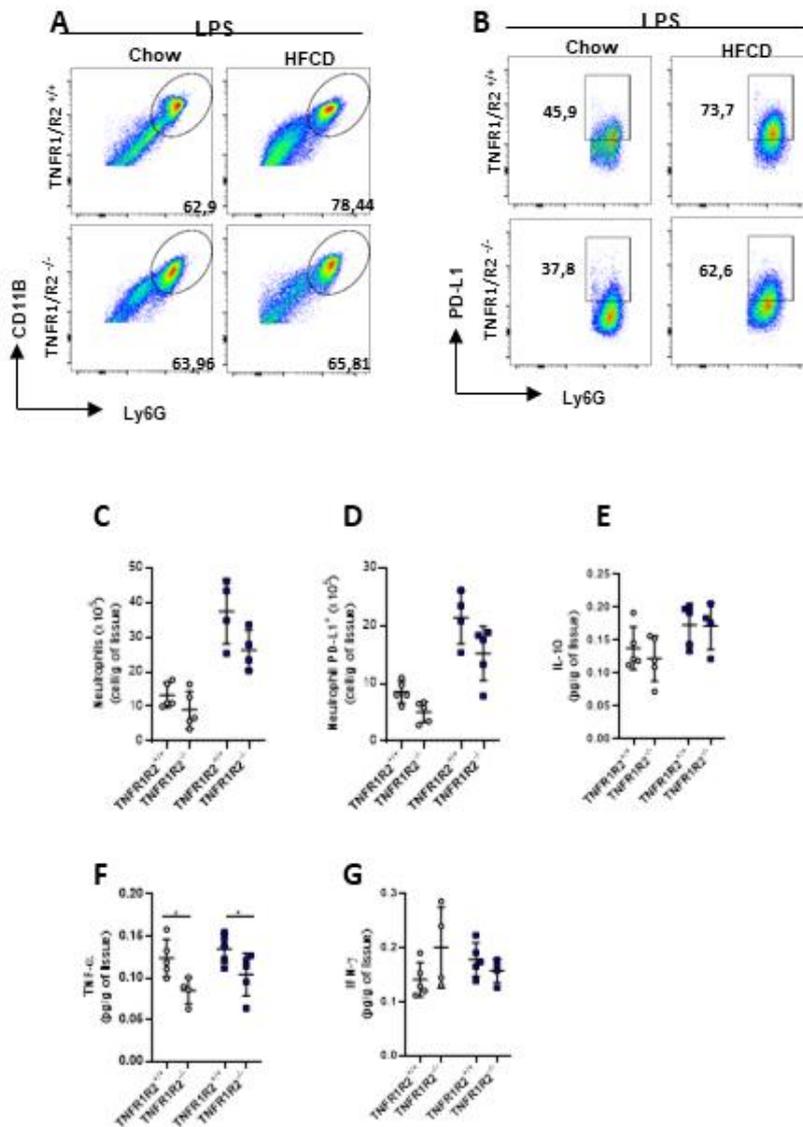


Figura 18. Os animais TNFR1/R2 ^{-/-} não apresentam redução na infiltração de neutrófilos no tecido hepático de animais com DHGNA durante a endotoxemia. (A) Gráfico representativo de citometria de fluxo mostrando neutrófilos (CD11B+Ly6G+), e (B) expressão de PD-L1 em neutrófilos. (C) Número de neutrófilos, e (D) número de neutrófilos PD-L1+ no fígado de camundongos com DHGNA e Chow e/ou TNFα (TNFR1R2^{-/-}), 6 horas após a inoculação de LPS (n=5 por grupo). (E) Secreção de IL-10, (F) TNF-α e (G) IFN-γ no fígado de camundongos Chow e NAFLD e/ou TNFα (TNFR1R2^{-/-}), 6 horas após a administração de LPS (10 mg/kg) (n=5).

4.9 O tratamento com anti-PD-L1 protege animais com NAFLD durante a hiper-inflamação

Para confirmar o papel funcional da PD-L1 expressa por neutrófilos na patologia da hiper-inflamação em camundongos com NAFL, investigamos se o uso de anticorpos anti-PD-L1, um medicamento biológico que se liga à PD-L1 inibindo sua interação com o PD-1, poderia atenuar a resposta inflamatória hepática com consequente redução da mortalidade. Para isso, tratamos os camundongos com anti-PD-L1 e em seguida injetamos LPS em camundongos WT com DHGNA (Fig19A). A administração intraperitoneal do medicamento anti-PD-L1, mas não do IgG (grupo controle), reduziu a resposta inflamatória no fígado (Fig19F) e o dano hepático (Fig19B), resultando em uma melhora na mortalidade dos hospedeiros (Fig19D). Além disso, observamos que esse tratamento também reduziu os níveis de TNF α , mas não de IFN- γ , no fígado dos camundongos (Fig19C). Importante destacar que o tratamento com anti-PDL1 preveniu o recrutamento de neutrófilos para o microambiente hepático induzido por LPS e a população elevada de neutrófilos expressando PD-L1 em animais alimentados com HFCD (Fig19J e 19L). Esses parâmetros não sofreram alterações nos camundongos alimentados com ração controle (Fig19G e 19H). Finalmente, não observamos alteração no número de células NK recrutadas em todos os grupos investigados (Fig19L e 19I). Em conjunto, nossos dados indicam que o tratamento com terapia anti-PD-L1 diminui seletivamente a produção exacerbada de TNF α derivada de neutrófilos em camundongos com DHGNA, sem interferir na atividade secretora de IFN- γ das células NK.

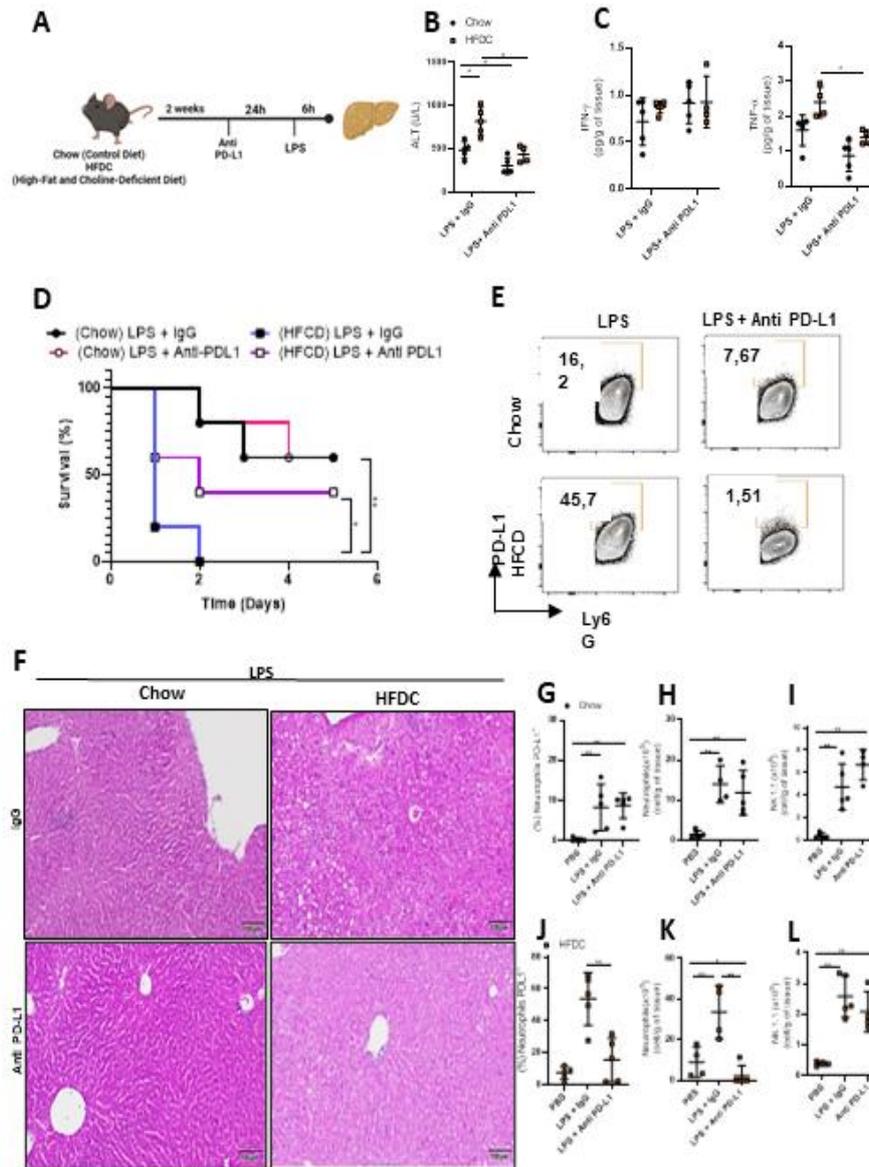


Figura 19. O tratamento com anti PD-L1 reduz os neutr3filos PD-L1 em animais com DHGNA durante a endotoxemia. (A) Ilustra33o esquem3tica do desenho experimental. (B) N3veis s3ricos de ALT de camundongos com DHGNA e Chow e/ou tratados com anti-PDL1, 6 horas ap3s a administra33o de 10 mg/kg de LPS e PBS (n=5). (C) Secre33o de IFN e TNF- α no f3gado de camundongos Chow e DHGNA injetados com LPS (10 mg/kg) e tratados com anti-PDL1 (n = 5). (D) Curvas de sobreviv3ncia de camundongos com NAFLD (n=5) e Chow (n=5) e/ou tratados com anti-PD-L1, 7 dias ap3s a inocula33o intraperitoneal de LPS (10 mg/kg). (E) Gr3fico representativo de citometria de fluxo mostrando a express3o de TNF em neutr3filos PD-L1+ no f3gado de animais com NAFLD e Chow e/ou tratados com anti-PD-L1 6 horas ap3s a inocula33o de LPS. (F) Efeito da inocula33o de LPS na histologia do f3gado de ratos com DHGNA e Chow e/ou tratados com anti-PD-L1. (G e J) Frequ3ncia de neutr3filos PD-L1, (H e K) N3mero de neutr3filos, (I e L) N3mero de c3lulas NK de animais com DHGNA e Chow e/ou tratados com anti-PDL1 ap3s 6 horas da inocula33o de LPS.

5. DISCUSSÃO

Até a pouco tempo atrás, a patogênese da DHGNA e sepse eram consideradas duas condições independentes e não interligadas que estavam associadas a respostas inflamatórias locais e sistêmicas específicas, respectivamente. A DHGNA é uma condição crônica do fígado caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado em indivíduos que não consomem quantidades excessivas de álcool. Por outro lado, a sepse é uma condição inflamatória sistêmica e exacerbada associada a uma resposta infecciosa que danifica os vitais órgãos do hospedeiro, como o fígado. No entanto, estudos epidemiológicos mais recentes têm sugerido que a presença de DHGNA pode estar associada a uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de formas mais severas de sepse (ACHARYA; BAJAJ, 2017; MOHAMMAD; THIEMERMANN, 2021). No entanto, embora os mecanismos precisos que associam a DHGNA com risco de desenvolver uma sepse mais letal não são compreendidos ainda, sugere-se que a inflamação crônica e a função imunológica comprometida em pacientes com DHGNA possam contribuir para o agravamento da doença.

Dado que a DHGNA e a sepse são doenças crescentes na área de saúde global, com opções terapêuticas bastante limitadas, mais estudos são necessários para o entendimento da sua correlação e para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento da sepse. No presente estudo, descrevemos pela primeira vez que camundongos alimentados com dieta rica em gordura e colesterol são mais susceptíveis a um estado hepático inflamatório, quando comparado com animais submetidos a dieta regular, após a administração de LPS, sugerindo que a DHGNA pode ser considerada um fator de risco crucial para a progressão da sepse. Curiosamente, é importante mencionar que estes animais alimentados por apenas

duas semanas (o padrão da literatura são quatro semanas), não foram diagnosticados com DHGNA uma vez que nenhum dano hepático foi detectado.

Além disso, exploramos os mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao eixo imunológico envolvido com a lesão hepática na DHGNA. Neste presente estudo, a administração de LPS em camundongos com DHGNA promoveu uma resposta inflamatória exacerbada decorrente do aparecimento de um fenótipo específico de granulócitos expressando PD-L1, que secretam altos níveis de TNF por uma via dependente da produção de IFN- γ secretada por células NK. Observamos também que outras células do sistema imunológico inato e adaptativo, como células T CD4+ e CD8+ e células mononucleares, respectivamente, não participaram da susceptibilidade dos camundongos ao desenvolvimento de resposta inflamatórias exacerbadas características da sepse. A compreensão dos mecanismos da resposta imune no fígado sugere que o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas a estes componentes do sistema imune pode ser altamente relevante na regulação da inflamação sistêmica na DHGNA prevenindo, conseqüentemente, a progressão dessa patologia para casos mais graves e letais.

A literatura vem apresentando a participação das células NK e neutrófilos durante o desenvolvimento da DHGNA (CHEN; TIAN, 2020; HWANG *et al.*, 2021b; MANTOVANI *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-CHANTAR; DELGADO; BERAZA, 2021b; STIGLUND *et al.*, 2019). Da mesma forma, durante processos infecciosos, como a sepse, ambas populações celulares estão relacionadas a conseqüências prejudiciais ao indivíduo (FALCINELLI *et al.*, 2023b; MCNAB *et al.*, 2011b; QIN *et al.*, 2019; THANABALASURIAR *et al.*, 2021b, c). No entanto, é desconhecido a importância dessas células quando ambas condições, sepse e DHGNA, acontecem simultaneamente. Com base na reanálise de dados bioinformáticas previamente

publicadas (SU *et al.*, 2021; YAO *et al.*, 2022), observamos que nossas descobertas foram semelhantes às encontradas em pacientes e camundongos com DHGNA diagnosticada, indicando respostas imunes semelhantes entre diferentes espécies de mamíferos. Esses dados mostraram que, em populações com DHGNA, IFN- γ e TNF α estão aumentados, e que, em camundongos alimentados com dieta rica em gordura e frutose, há aumento de IFN- γ nas células NK, e de TNF α e CD274 (PD-L1) nas células mieloides (SU *et al.*, 2021; YAO *et al.*, 2022). Assim, esses dados reforçam nosso estudo atual, indicando possíveis componentes celulares e seus produtos envolvidos na susceptibilidade da DHGNA à sepse.

As células NK, células linfoides inatas que desempenham funções efetoras, como a produção de IFN- γ e citotoxicidade, são componentes importantes na eliminação de microrganismos invasores por meio da ativação de diferentes tipos de leucócitos. Por exemplo, durante uma condição infecciosa, as células NK podem interagir com neutrófilos circulantes através da secreção de IFN e quimiocinas, promovendo seu recrutamento para o local da infecção e levando à eliminação bacteriana. No entanto, na sepse grave, as células NK e o IFN- γ originado das células NK desempenham um papel prejudicial na sobrevivência do hospedeiro durante a inflamação sistêmica (ROMERO *et al.*, 2010; ZEERLEDER *et al.*, 2005). As células NK podem estimular os neutrófilos a liberar citocinas (COSTANTINI; CASSATELLA, 2011), promovendo a granulopoiese que leva ao aumento na corrente sanguínea destas células e sua subsequente migração para órgãos vitais, que contribui para a patogênese da sepse (ETOGO *et al.*, 2008). Na sepse, a ativação e a função das células NK geralmente estão prejudicadas, como a produção de IFN- γ , o que pode gerar a uma capacidade reduzida de eliminar células infectadas e, portanto, no controle a infecção (KUMAR, 2019b). Na DHGNA, as células NK também se

encontram alteradas acumulando-se no fígado de indivíduos com NAFLD. Uma vez ativadas, estas células produzem IFN- γ que contribui para o desenvolvimento de inflamação hepática e fibrose (LUO *et al.*, 2013). Realmente, estas duas enfermidades, a sepse e a DHGNA, apresentam inúmeras similaridades em relação a alterações das células NK como, por exemplo, aumento no número de células infiltradas no tecido hepático (LUO *et al.*, 2013; SMALL *et al.*, 2008). Portanto, uma vez que a ativação de células NK na sepse e DHGNA, com consequente secreção de IFN- γ , desempenham uma função crucial na susceptibilidade dessas duas enfermidades, acredita-se que elas poderiam atuar sinergicamente, aumentando a produção de IFN- γ e a severidade da sepse em pacientes com DHGNA. No entanto, os mecanismos exatos subjacentes ao papel das células NK na DHGNA e sua interação com outros componentes do sistema imunológico ainda não são relatados.

Neste estudo, demonstramos que as células NK promovem a diferenciação de neutrófilos por meio do sinalizador IFN- γ , uma vez que animais com células NK depletadas não apresentam o fenótipo caracterizado pela presença de neutrófilos ativados. Além disso, mostramos que diferentes estímulos inflamatórios, incluindo o IFN- γ , diminuem a taxa de apoptose e induzem a expressão de PD-L1 nos neutrófilos em meio de cultura. Esses resultados são suportados por estudos prévios que demonstraram que as células NK podem estimular diferentes funções e o aumento da sobrevivência de neutrófilos (BHATNAGAR *et al.*, 2010). Portanto, o aumento de células NK durante a sepse, seguido pela ativação e estimulação dos neutrófilos, desempenha um papel crítico na resposta exacerbada do hospedeiro ao estímulo inflamatório (LPS). Esta descoberta sugere que este eixo células NK-IFN-neutrófilos pode ser alvo de uma intervenção terapêutica promissora para o tratamento de

pacientes com sepse com diagnóstico de DHGNA e na prevenção do desenvolvimento de sepse em pacientes com DHGNA.

Os neutrófilos são células imunes inatas que representam a primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Essas células podem eliminar bactérias e impedir a disseminação da infecção por mecanismos como fagocitose e liberação de produtos antibacterianos, como proteases, espécies reativas de oxigênio, armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e moléculas pró-inflamatórias, como citocinas (ROSALES, 2018). No entanto, a migração indesejada de neutrófilos para diferentes órgãos letais, seguida da sua ativação excessiva, pode causar diversos danos teciduais indesejados que podem ser letais ao hospedeiro. A disfunção dos neutrófilos durante a sepse é bem descrita e contribui para a sua patologia por meio da liberação excessiva de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas, que estão envolvidos com danos graves em diferentes órgãos vitais (BORDON *et al.*, 2013; MICHELS *et al.*, 2022; TRACEY *et al.*, 1986). Embora os macrófagos esplênicos tenham sido considerados uma fonte relevante de citocinas em animais com endotoxemia (HUSTON *et al.*, 2006), um estudo recente também identificou a relevância do fígado, por meio das células de Kupffer, na geração sistêmica desses mediadores inflamatórios (FONSECA *et al.*, 2021). Nossos dados demonstram que, durante uma síndrome metabólica como a DHGNA, os neutrófilos hepáticos são as principais fontes de produção de TNF α , influenciando na susceptibilidade à endotoxemia. No entanto, embora o papel-chave das citocinas, como o TNF, na progressão da sepse já esteja muito bem estabelecido, indicando que a terapia biológica poderia ser uma estratégia potencial para o tratamento dessa síndrome (SOUZA *et al.*, 2017), diferentes ensaios clínicos utilizando moléculas anti-citocinas têm se mostrado infrutíferos na sepse, causando considerável frustração (GUIDET;

STAIKOWSKY; OFFENSTADT, 1993; HADID *et al.*, 1999). Provavelmente, a não funcionalidade de terapias biológicas na sepse é decorrente do alto grau de heterogeneidade e função das assinaturas imunológicas de diferentes grupos de pacientes sépticos, uma vez que esta doença é de condição patológica de alta complexidade. Uma vez que nossos dados experimentais, e apoiados por dados transcriptômicos e de células únicas anteriores sugerem a importância dos neutrófilos na patologia da DHGNA (GOVAERE *et al.*, 2020; SU *et al.*, 2021), avaliamos se a neutralização dessas células com anticorpos específicos poderia melhorar a sobrevivência de camundongos endotoxêmicos com HFDC. Diversas estratégias para depletar neutrófilos vem sendo estudadas com ímpeto em inúmeros contextos clínicos (LESLIE *et al.*, 2022,), incluindo o uso de inibidores de CXCR2 em alguns pacientes com NASH (LESLIE *et al.*, 2022,). Aqui, demonstramos que a depleção dos neutrófilos com diferentes tratamentos biológicos como CXCR2i e anti-Ly6G reduziram as lesões hepáticas induzidas pela inflamação. No entanto, é de conhecimento que a neutralização dos neutrófilos pode ser perigosa, uma vez que essas células desempenham uma função primária importante na eliminação de micro-organismos durante infecções e que, portanto, sua depleção integral poderia aumentar a disseminação bacteriana sistêmica (TORRES-DUÉAS *et al.*, 2007). Uma vez que observamos que os neutrófilos responsáveis pelos danos hepáticos em camundongos endotoxêmicos com DHGNA apresentaram um fenótipo específico com alta expressão de PD-L1, propusemos que a administração de moléculas anti-PDL-1 poderia melhorar a sobrevivência sem abolir as funções protetoras dos neutrófilos uma vez que eliminaríamos apenas a subpopulação de células responsável pelo aumento da resposta inflamatória excessiva na DHGNA.

Diferentes estudos já demonstraram que neutrófilos podem expressar níveis elevados de PD-L1 em várias condições infecciosas agudas e inflamatórias, exercendo um fenótipo imunossupressor ao suprimir a interação entre PD-1 e células T (KIM *et al.*, 2018; KORNEPATI; VADLAMUDI; CUIEL, 2022; PFISTER *et al.*, 2021; WANG, J. F. *et al.*, 2015). Além disso, estudos recentes apresentam também que durante a sepse experimental, neutrófilos que expressam PD-L1 também desempenham funções imunossupressoras que são responsáveis pela elevada suscetibilidade a infecções secundárias (THANABALASURIAR *et al.*, 2021d). Em contraste com esses estudos, outro estudo recente demonstrou que neutrófilos pró-inflamatórios que expressam PD-L1 em níveis elevados são responsáveis por induzir lesões pulmonares durante a sepse (WANG, J. FENG *et al.*, 2021a). Embora contraditórios, esses achados são consistentes, uma vez que a sepse é uma síndrome caracterizada por uma fase pró-inflamatória inicial, seguida por uma segunda fase imunossupressora (LIU *et al.*, 2022). No presente estudo, observamos que uma subpopulação exclusiva de neutrófilos que expressam PD-L1 desempenha um papel crucial na patologia da sepse em camundongos alimentados com dieta HFDC, uma vez que o tratamento biológico com anti-PD-L1 provoca uma diminuição dramática no número de neutrófilos que expressam TNF α +PD-L1+ em camundongos alimentados com dieta HDB. Além disso, o tratamento com anti-PD-L1 reduz a presença dessas células no ambiente hepático e a liberação excessiva de mediadores inflamatórios induzidos pela endotoxemia. Esse efeito foi acompanhado pela prevenção na produção de TNF α e nos danos no fígado, bem como na redução da alta taxa de mortalidade em camundongos com DHGNA. Neste estudo, propusemos um novo eixo imunológico em camundongos sépticos com DHGNA células NK-IFN-neutrófilos, na qual estes últimos apresentam uma expressão elevada de PD-L1, e demonstramos

que esse fenótipo pró-inflamatório está vinculado à produção maciça de TNF α , levando camundongos alimentados com dieta HFDC a uma elevada suscetibilidade para o desenvolvimento de sepse severa, decorrente de uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada.

Com base em nossos dados atuais e estudos anteriores, é razoável afirmar que condições clínicas e ambientais individuais, como doenças infecciosas e crônicas prévias, dieta e idade (STANSKI; WONG, 2020), podem agravar as respostas inflamatórias na sepse. Esse fato dificulta o uso de marcadores atuais e estratégias farmacológicas em todos os indivíduos diagnosticados com sepse ou naqueles com predisposição para desenvolver essa síndrome, principalmente idosos e imunocomprometidos. Além disso, novos estudos focados na associação entre essas condições clínicas iniciais, inclusive na DHGNA, e a progressão da sepse poderiam melhorar a implementação de diagnósticos e tratamentos terapêuticos baseados em medicina de precisão [70]. Por exemplo, na NAFLD, a redução dos níveis de TNF através da depleção de neutrófilos ou priorizando o uso da terapia anti-PD-L1 durante a inflamação sistêmica poderia ser uma estratégia de tratamento eficaz e individualizada em pacientes previamente diagnosticados com alterações hepáticas, prevenindo a evolução para uma condição mais grave. Finalmente, nosso estudo também incentiva a busca por marcadores biológicos inéditos para doenças metabólicas do fígado em indivíduos com lesões hepáticas não detectáveis, a fim de prever o risco de agravamento de respostas infecciosas ou inflamatórias.

CONCLUSÃO

Em resumo, nossos achados *(i)* fornecem uma base biológica que explica o aumento de suscetibilidade da sepse na DHGNA, destacando a caracterização de uma subpopulação de neutrófilos como um componente característicos na síndrome metabólica hepática e responsável pelo aumento da resposta inflamatória sistêmica, e *(ii)* incentivam o desenvolvimento de intervenções farmacológicas biológicas e de diagnóstico capazes de tratar e prevenir a progressão da sepse em pacientes com DHGNA.

7. REFERÊNCIAS

ABE, T. et al. Epidemiology of sepsis and septic shock in intensive care units between sepsis-2 and sepsis-3 populations: sepsis prognostication in intensive care unit and emergency room (SPICE-ICU). *Journal of Intensive Care*, v. 8, n. 1, p. 1–9, 30 jun. 2020a. Disponível em: <<https://jintensivecare.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40560-020-00465-0>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

ABE, T. et al. Epidemiology of sepsis and septic shock in intensive care units between sepsis-2 and sepsis-3 populations: sepsis prognostication in intensive care unit and emergency room (SPICE-ICU). *Journal of Intensive Care*, v. 8, n. 1, 30 jun. 2020b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32612839/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

ACHARYA, C.; BAJAJ, J. S. Gut Microbiota and Complications of Liver Disease. *Gastroenterology clinics of North America*, v. 46, n. 1, p. 155–169, 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28164848/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 783–801, 24 fev. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16497588/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

ALVES-FILHO, J. C. et al. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 10, p. 4018–4023, 10 mar. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19234125/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

ANDONEGUI, G. et al. Mice that exclusively express TLR4 on endothelial cells can efficiently clear a lethal systemic Gram-negative bacterial infection. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 7, p. 1921, 7 jul. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19210000/>. Acesso em: 3 out. 2023.

ANGULO, P. et al. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, v. 149, n. 2, p. 389- 397.e10, 1 ago. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25935633/>. Acesso em: 1 out. 2023.

ARASE, H.; ARASE, N.; SAITO, T. Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *The Journal of experimental medicine*, v. 183, n. 5, p. 2391–2396, 1 maio 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8642351/>. Acesso em: 4 out. 2023.

AMER J, et al. Insulin signaling as a potential natural killer cell checkpoint in fatty liver disease. *Hepatology Commun* 2018;2:285–98. <https://doi.org/10.1002/HEP4.1146>

BADGWELL, B. et al. Natural killer cells contribute to the lethality of a murine model of Escherichia coli infection. *Surgery*, v. 132, n. 2, p. 205–212, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12219013/>. Acesso em: 3 out. 2023.

BASU, R.; NOUREDDIN, M.; CLARK, J. M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Review of Management for Primary Care Providers. *Mayo Clinic proceedings*, v. 97, n. 9, p. 1700–1716, 1 set. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36058582/>. Acesso em: 3 out. 2023.

BHATNAGAR, N. et al. Cytokine-activated NK cells inhibit PMN apoptosis and preserve their functional capacity. *Blood*, v. 116, n. 8, p. 1308–1316, 26 ago. 2010.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20501895/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

BIRON, C. A. et al. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology*, v. 17, p. 189–220, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10358757/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

BJÖRKSTRÖM, N. K.; STRUNZ, B.; LJUNGGREN, H. G. Natural killer cells in antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology* 2021 22:2, v. 22, n. 2, p. 112–123, 11 jun. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41577-021-00558-3>>. Acesso em: 3 out. 2023.

BORDON, J. et al. Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, v. 17, n. 2, fev. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23069683/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

BROWN, K. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet (London, England)*, v. 368, n. 9530, p. 157–169, 8 jul. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16829300/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental*, v. 65,

BURKE JD. et al. IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Semin Immunol* 2019;43: 101280. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2019.05.002>. n. 8, p.

1038–1048, 1 ago. 2016. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26823198/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

CAHILL, L. A. et al. Circulating Factors in Trauma Plasma Activate Specific Human Immune Cell Subsets. *Injury*, v. 51, n. 4, p. 819–829, 1 abr. 2020. Acesso em: 3 out. 2023.

CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. *Blood*, v. 112, n. 3, p. 461–469, 1 ago. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18650461/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

CARRANZA-TREJO, A. M. et al. Hepatocyte and immune cell crosstalk in non-alcoholic fatty liver disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, v. 15, n. 7, p. 783–796, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33557653/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

CHALASANI, N. et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 67, n. 1, p. 328–357, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28714183/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

CHEN, Y.; TIAN, Z. Roles of Hepatic Innate and Innate-Like Lymphocytes in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Frontiers in immunology*, v. 11, 16 jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32765518/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

CHRYSANTHOPOULOU, A. et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *The Journal of pathology*, v. 233, n. 3, p. 294–307, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24740698/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 885–891, 26 dez. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12490963/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

COSTANTINI, C.; CASSATELLA, M. A. The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. *Journal of leukocyte biology*, v. 89, n. 2, p. 221–233, 3 ago. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20682626/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

CRAIG, A. et al. Neutrophil Recruitment to the Lungs during Bacterial Pneumonia. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 2, p. 568, fev. 2009. Disponível em: <</pmc/articles/PMC2632043/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

DE LIMA, M. H. F. et al. Sepsis-Induced Immunosuppression Is Marked by an Expansion of a Highly Suppressive Repertoire of FOXP3+ T-Regulatory Cells Expressing TIGIT. *The Journal of infectious diseases*, v. 225, n. 3, p. 531–541, 1 fev. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34379757/>>. Acesso em: 2 out. 2023.

DHAINAUT, J. F. et al. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Critical care medicine*, v. 29, n. 7 Suppl, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11445733/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

DINARELLO, C. A. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Current topics in microbiology and immunology*, v. 216, p. 133–165, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8791739/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

DYSON, J. K.; ANSTEE, Q. M.; MCPHERSON, S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging. *Frontline gastroenterology*, v.

5, n. 3, p. 211–218, jul. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25018867/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

DONG et al. Increased PD-L1 Restricts Liver Injury in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2022;2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5954437>.

EBRAHIMI, F. et al. Risk of Severe Infection in Patients With Biopsy-proven Nonalcoholic Fatty Liver Disease – A Population-based Cohort Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2023. Disponível em: <<https://medicalxpress.com/news/2023-05-high-severe-infections-individuals-nonalcoholic.html>>. Acesso em: 4 out. 2023.

EKSTEDT, M. et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 61, n. 5, p. 1547–1554, 1 maio 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25125077/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

ENOH, V. T. et al. Differential effect of imipenem treatment on wild-type and NK cell-deficient CD8 knockout mice during acute intra-abdominal injury. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 290, n. 3, p. 685–693, mar. 2006. Disponível em: <<https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00678.2005>>. Acesso em: 3 out. 2023.

ERIGUCHI, Y. et al. Essential role of IFN- γ in T cell-associated intestinal inflammation. *JCI insight*, v. 3, n. 18, 20 set. 2018a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30232288/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

ERIGUCHI, Y. et al. Essential role of IFN- γ in T cell-associated intestinal inflammation. *JCI insight*, v. 3, n. 18, 20 set. 2018b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30232288/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

ETOGO, A. O. et al. NK but not CD1-restricted NKT cells facilitate systemic inflammation during polymicrobial intra-abdominal sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 180, n. 9, p. 6334–6345, 1 maio 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18424757/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

FAN, Y. et al. Hepatic NK cells attenuate fibrosis progression of non-alcoholic steatohepatitis in dependent of CXCL10-mediated recruitment. *Liver Int.*, 2020

FALCINELLI, M. et al. Propranolol reduces IFN- γ driven PD-L1 immunosuppression and improves anti-tumour immunity in ovarian cancer. *Brain, behavior, and immunity*, v. 110, p. 1–12, 1 maio 2023a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36796704/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

FALCINELLI, M. et al. Propranolol reduces IFN- γ driven PD-L1 immunosuppression and improves anti-tumour immunity in ovarian cancer. *Brain, behavior, and immunity*, v. 110, p. 1–12, 1 maio 2023b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36796704/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

FONSECA, M. T. et al. A leukotriene-dependent spleen-liver axis drives TNF production in systemic inflammation. *Science signaling*, v. 14, n. 679, 20 abr. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33879603/>>. Acesso em: 8 abr. 2023.

FREUD, A. G.; CALIGIURI, M. A. Human natural killer cell development. *Immunological reviews*, v. 214, n. 1, p. 56–72, dez. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17100876/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

GOVAERE, O. et al. Transcriptomic profiling across the nonalcoholic fatty liver disease spectrum reveals gene signatures for steatohepatitis and fibrosis. *Sci. Transl. Med.* [S.l: s.n.], 2020. Disponível em: <<https://www.science.org>>.

GEBRU et al. T cell subsets and Natural Killers Cells in pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34830072/>. Acesso em: 1 out. 2023.

GROSS, O. et al. The inflammasome: an integrated view. *Immunological reviews*, v. 243, n. 1, p. 136–151, set. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21884173/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

GUIDET, B.; STAIKOWSKY, F.; OFFENSTADT, G. [Interleukins and TNF in septic shock]. *La Revue du praticien*, v. 43, n. 1, p. 13–17, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8469892/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

GUO, Y. et al. The biology of natural killer cells during sepsis. *Immunology*, v. 153, n. 2, p. 190, 1 fev. 2018a. Disponível em: <</pmc/articles/PMC5765373/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

GUO, Y. et al. The biology of natural killer cells during sepsis. *Immunology*, v. 153, n. 2, p. 190–202, 1 fev. 2018b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29064085/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

HADID, R. et al. Role of several mediators of inflammation on the mouse hypothalamo-pituitary-adrenal axis response during acute endotoxemia. *Neuroimmunomodulation*, v. 6, n. 5, p. 336–343, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10474052/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

HE, H. et al. NK cells promote neutrophil recruitment in the brain during sepsis-induced neuroinflammation. *Scientific reports*, v. 6, 8 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27270556/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

HER. Z. et al. CD4+ T cells mediate the development of liver fibrosis in high fat diet-induced NAFLD in humanized mice. 2020

HUSTON, J. M. et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *The Journal of experimental medicine*, v. 203, n. 7, p. 1623–1629, 10 jul. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16785311/>>. Acesso em: 8 abr. 2023.

HWANG, S. et al. Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Frontiers in endocrinology*, v. 12, 11 out. 2021a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34707573/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

HWANG, S. et al. Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Frontiers in endocrinology*, v. 12, 11 out. 2021b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34707573/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

JENSEN, I. J. et al. Polymicrobial sepsis influences NK-cell-mediated immunity by diminishing NK-cell-intrinsic receptor-mediated effector responses to viral ligands or infections. *PLoS pathogens*, v. 14, n. 10, 1 out. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30379932/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

KHAN, A. A.; LIU, Z. K.; XU, X. Recent advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*, v. 20, n. 6, p. 511–520, 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34344612/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

KHAWAR, B.; ABBASI, M. H.; SHEIKH, N. A panoramic spectrum of complex interplay between the immune system and IL-32 during pathogenesis of various systemic infections and inflammation. *European journal of medical research*, v. 20, n. 1, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25626592/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

KIM, H. D. et al. Association Between Expression Level of PD1 by Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells and Features of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, v. 155, n. 6, p. 1936- 1950.e17, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30145359/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

KIRAN, S. et al. High Fat Diet-Induced CD8+ T Cells in Adipose Tissue Mediate Macrophages to Sustain Low-Grade Chronic Inflammation. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 680944, 23 jun. 2021. Acesso em: 1 out. 2023.

KORNEPATI, A. V. R.; VADLAMUDI, R. K.; CURIEL, T. J. Programmed death ligand 1 signals in cancer cells. *Nature reviews. Cancer*, v. 22, n. 3, p. 174–189, 1 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35031777/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

KRENKEL, O. et al. Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 67, n. 4, p. 1270–1283, 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28940700/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

KUBES, P.; MEHAL, W. Z. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*, v. 143, n. 5, p. 1158–1172, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22982943/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

KUMAR, V. Natural killer cells in sepsis: Underprivileged innate immune cells. *European journal of cell biology*, v. 98, n. 2–4, p. 81–93, 1 jun. 2019a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30583806/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

KUMAR, V. Natural killer cells in sepsis: Underprivileged innate immune cells. *European journal of cell biology*, v. 98, n. 2–4, p. 81–93, 1 jun. 2019b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30583806/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

LESLIE, J. et al. CXCR2 inhibition enables NASH-HCC immunotherapy. *Gut*, v. 71, n. 10, p. 2093–2106, 1 out. 2022. Disponível em: <<https://gut.bmj.com/content/71/10/2093>>. Acesso em: 9 abr. 2023.

LI, M. et al. Recent advances targeting C-C chemokine receptor type 2 for liver diseases in monocyte/macrophage. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, v. 40, n. 12, p. 2928–2936, 1 dez. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33025657/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

LIN, Q. et al. IFN- γ -dependent NK cell activation is essential to metastasis suppression by engineered Salmonella. *Nature communications*, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33953170/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

LOMBARDI L, et al. PD-1/PD-L1 Immuno-Mediated Therapy in NAFLD: Advantages and Obstacles in the Treatment of Advanced Disease. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/IJMS23052707>

LIN, Q. et al. IFN- γ -dependent NK cell activation is essential to metastasis suppression by engineered Salmonella. *Nature communications*, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33953170/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

LIU, D. et al. Sepsis-induced immunosuppression: mechanisms, diagnosis and current treatment options. *Military Medical Research*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36209190/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

LUO, X. Y. et al. IFN- γ deficiency attenuates hepatic inflammation and fibrosis in a steatohepatitis model induced by a methionine- and choline-deficient high-

fat diet. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, v. 305, n. 12, 15 dez. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24136786/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nature reviews. Immunology, v. 11, n. 8, p. 519–531, ago. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21785456/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

MARCHESINI, G. et al. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. Journal of hepatology, v. 64, n. 6, p. 1388–1402, 1 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27062661/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

MARTÍNEZ-CHANTAR, M. L.; DELGADO, T. C.; BERAZA, N. Revisiting the Role of Natural Killer Cells in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Frontiers in immunology, v. 12, 18 fev. 2021a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33679803/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

MARTÍNEZ-CHANTAR, M. L.; DELGADO, T. C.; BERAZA, N. Revisiting the Role of Natural Killer Cells in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Frontiers in immunology, v. 12, 18 fev. 2021b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33679803/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

MCNAB, F. W. et al. Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. European journal of immunology, v. 41, n. 7, p. 1941–1947, jul. 2011a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21509782/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

MCNAB, F. W. et al. Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. European journal of

immunology, v. 41, n. 7, p. 1941–1947, jul. 2011b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21509782/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

MICHELS, E. H. A. et al. Association between age and the host response in critically ill patients with sepsis. *Critical Care*, v. 26, n. 1, 1 dez. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36514130/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

MOHAMMAD, S.; THIEMERMANN, C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Frontiers in immunology*, v. 11, 11 jan. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33505393/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

HE H, et al. NK cells promote neutrophil recruitment in the brain during sepsis-induced neuroinflammation. *Scientific Reports* 2016 6:1 2016;6:1–14. <https://doi.org/10.1038/srep27711>

JENSEN IJ, et al. Polymicrobial sepsis influences NK-cell-mediated immunity by diminishing NK-cell-intrinsic receptor-mediated effector responses to viral ligands or infections. *PLoS Pathog* 2018;14:e1007405. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1007405>.

PFISTER, D. et al. NASH limits anti-tumour surveillance in immunotherapy-treated HCC. *Nature*, v. 592, n. 7854, p. 450–456, 15 abr. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33762733/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

QIAN, Y. et al. IL-17 signaling in host defense and inflammatory diseases. *Cellular & molecular immunology*, v. 7, n. 5, p. 328–333, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20514051/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

QIN, W. et al. The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. *Frontiers in immunology*, v. 10, 4 out. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31636634/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

RAU, M. Progression from nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis is marked by higher frequency of Th17 cells in the liver and a increased Th17/resting regulatory t cell ratio in peripheral blood and in the liver. *J. Immunology*, 2016

RELJA, B.; LAND, W. G. Damage-associated molecular patterns in trauma. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, v. 46, n. 4, p. 751, 1 ago. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7427761/>. Acesso em: 2 out. 2023.

RHODES, A. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive care medicine*, v. 43, n. 3, p. 304–377, 1 mar. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28101605/>. Acesso em: 1 out. 2023.

RINELLA, M. E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*, v. 313, n. 22, p. 2263–2273, 9 jun. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26057287/>. Acesso em: 1 out. 2023.

RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 175, n. 5, p. 490–497, 1 mar. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17138957/>. Acesso em: 3 out. 2023.

ROMERO, C. R. et al. The role of interferon- γ in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. *Journal of leukocyte biology*, v. 88, n. 4, p. 725–735, 13 jul. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20628064/>. Acesso em: 3 out. 2023.

ROSALES, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Frontiers in physiology*, v. 9, n. FEB, 20 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29515456/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

SERBINA, N. V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annual review of immunology*, v. 26, p. 421–452, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18303997/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

SHERWOOD, E. R. et al. Beta 2 microglobulin knockout mice are resistant to lethal intraabdominal sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 167, n. 12, p. 1641–1649, 15 jun. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12626348/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

SHERWOOD, E. R. et al. Mice depleted of CD8+ T and NK cells are resistant to injury caused by cecal ligation and puncture. *Laboratory Investigation*, v. 84, n. 12, p. 1655–1665, 1 dez. 2004. Disponível em: <<http://www.laboratoryinvestigation.org/article/S002368372260165X/fulltext>>. Acesso em: 3 out. 2023.

SMALL, C.-L. et al. NK cells play a critical protective role in host defense against acute extracellular *Staphylococcus aureus* bacterial infection in the lung. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 180, n. 8, p. 5558–5568, 15 abr. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18390740/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

SMYTH, M. J. et al. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological reviews*, v. 202, p. 275–293, dez. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15546400/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

SOUZA, M. C. et al. Chronic *Toxoplasma gondii* Infection Exacerbates Secondary Polymicrobial Sepsis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7,

n. APR, 7 abr. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28439500/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

STANSKI, N. L.; WONG, H. R. Prognostic and predictive enrichment in sepsis. *Nature reviews. Nephrology*, v. 16, n. 1, p. 20–31, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31511662/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

STENGER, S. et al. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *The Journal of experimental medicine*, v. 183, n. 4, p. 1501–1514, 1 abr. 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8666908/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

STIGLUND, N. et al. Retained NK cell phenotype and functionality in non-alcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. JUN, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31214196/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

SU, Q. et al. Single-cell RNA transcriptome landscape of hepatocytes and non-parenchymal cells in healthy and NAFLD mouse liver. *iScience*, v. 24, n. 11, 19 nov. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34755088/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

SUN, J. C.; LANIER, L. L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. *Nature reviews. Immunology*, v. 11, n. 10, p. 645–657, out. 2011a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21869816/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

SUN, J. C.; LANIER, L. L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. *Nature reviews. Immunology*, v. 11, n. 10, p. 645–657, out. 2011b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21869816/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

TACKE, F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *Journal of hepatology*, v. 66, n. 6, p. 1300–1312, 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28267621/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

TARGHER, G.; BYRNE, C. D. Clinical Review: Nonalcoholic fatty liver disease: a novel cardiometabolic risk factor for type 2 diabetes and its complications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 98, n. 2, p. 483–495, fev. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23293330/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

THANABALASURIAR, A. et al. PD-L1+ neutrophils contribute to injury-induced infection susceptibility. *Science advances*, v. 7, n. 10, 3 mar. 2021a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674305/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

THANABALASURIAR, A. et al. PD-L1+ neutrophils contribute to injury-induced infection susceptibility. *Science advances*, v. 7, n. 10, 3 mar. 2021b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674305/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

THANABALASURIAR, A. et al. PD-L1+ neutrophils contribute to injury-induced infection susceptibility. *Science advances*, v. 7, n. 10, 3 mar. 2021c. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674305/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

THANABALASURIAR, A. et al. PD-L1+ neutrophils contribute to injury-induced infection susceptibility. *Science advances*, v. 7, n. 10, 3 mar. 2021d. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33674305/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 52, n. 5, p. 1836–1846, nov. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21038418/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

TORRES-DUÑAS, D. et al. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. *British journal of pharmacology*, v. 152, n. 3, p. 341–352, out. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17641671/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

TOSELLO-TRAMPONT, A. et al. Immunoregulatory Role of NK Cells in Tissue Inflammation and Regeneration. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. MAR, p. 301, 20 mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30116711/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

TOSELLO-TRAMPONT, A. et al. NKp46+ natural killer cells attenuate metabolism-induced hepatic fibrosis by regulating macrophage activation in mice. *Hepatology*, v. 8, n. MAR, p. 301, 20 mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26616711/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

TRACEY, K. J. et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science (New York, N.Y.)*, v. 234, n. 4775, p. 470–474, 1986. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3764421/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

TRAPANI, J. A. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biology* 2001 2:12, v. 2, n. 12, p. 1–7, 23 nov. 2001. Disponível em: <<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2001-2-12-reviews3014>>. Acesso em: 3 out. 2023.

VAN DER POLL, T.; OPAL, S. M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet (London, England)*, v. 374, n. 9700, p. 1543–

1556, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19880020/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

VAN DER WINDT, D. J. et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammation and Development of Hepatocellular Carcinoma in Nonalcoholic Steatohepatitis. v. 68, n. 4, 2018.

VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSI, Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 34, n. 3, p. 274–285, ago. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21623852/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (New York, N.Y.)*, v. 331, n. 6013, p. 44–49, 7 jan. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21212348/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*, v. 10, n. 1, p. 45–65, 1 jan. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12655295/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

WANG, D.; YIN, Y.; YAO, Y. Advances in sepsis-Associated liver dysfunction. *Burns and Trauma*, v. 2, n. 3, p. 97–105, 1 jul. 2014. Disponível em: <<https://burnstrauma.biomedcentral.com/articles/10.4103/2321-3868.132689>>. Acesso em: 3 out. 2023.

WANG F et al. Activated Natural Killer Cell Promotes Nonalcoholic Steatohepatitis Through Mediating JAK/STAT Pathway. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2022;13:257. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2021.08.019>.

WANG, F. et al. Natural killer cells in sepsis: Friends or foes? *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1101918, 26 jan. 2023. Acesso em: 3 out. 2023.

WANG, J. F. et al. Up-regulation of programmed cell death 1 ligand 1 on neutrophils may be involved in sepsis-induced immunosuppression: an animal study and a prospective case-control study. *Anesthesiology*, v. 122, n. 4, p. 852–863, 20 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25437496/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

WANG, J. FENG et al. Upregulated PD-L1 delays human neutrophil apoptosis and promotes lung injury in an experimental mouse model of sepsis. *Blood*, v. 138, n. 9, p. 806–810, 2 set. 2021a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34473230/>>. Acesso em: 3 abr. 2023.

WANG, J. FENG et al. Upregulated PD-L1 delays human neutrophil apoptosis and promotes lung injury in an experimental mouse model of sepsis. *Blood*, v. 138, n. 9, p. 806–810, 2 set. 2021b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34473230/>>. Acesso em: 4 out. 2023.

WANG, J.-F. et al. Brief Report Upregulated PD-L1 delays human neutrophil apoptosis and promotes lung injury in an experimental mouse model of sepsis. . [S.l: s.n.], 2021.

WREE, A. et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, v. 59, n. 3, p. 898–910, mar. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23813842/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

YAO, K. et al. Transcriptomic profiling of a multiethnic pediatric NAFLD cohort reveals genes and pathways associated with disease. *Hepatology communications*, v. 6, n. 7, p. 1598–1610, 1 jul. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35312185/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

YOUNOSSI, Z. et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, v. 15, n. 1, p. 11–20, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28930295/>>. Acesso em: 1 out. 2023.

ZEERLEDER, S. et al. Activated cytotoxic T cells and NK cells in severe sepsis and septic shock and their role in multiple organ dysfunction. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, v. 116, n. 2, p. 158–165, ago. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15993363/>>. Acesso em: 3 out. 2023.

70 R Core Team (2023). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

72 Hao and Hao et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* (2021)

73 Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.

74 Marsh SE (2021). *scCustomize: Custom Visualizations & Functions for Streamlined Analyses of Single Cell Sequencing*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5706430>.

ANEXO I



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *“Papel das NETs no desenvolvimento das lesões e fibrose hepáticas causadas pela sepse”*, registrado com o número de protocolo **193/2019**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 25 de novembro de 2019.

Colaborador: Cleyson da Cruz Oliveira Barros

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			25/11/2019 a 20/11/2024	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl 6	135	20g / 42 dias	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / PAD4-/-	60	20g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento da Clínica Médica

Ribeirão Preto, 25 de novembro de 2019

Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP